

REPLICACIÓN Y MORFOGÉNESIS DE ASTROVIRUS.

Santiago Caballero

Tesis Doctoral



Departament de Microbiologia

Facultat de Biologia

Universitat de Barcelona



Albert Bosch i Navarro, Catedrático del Departamento de Microbiología, i
Rosa M^a Pintó i Solé, Profesora Titular del Departamento de Microbiología de
la Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona,

CERTIFICAN,

Que el trabajo de investigación presentado por **Santiago Caballero Diez** y
titulado “**Replicación y Morfogénesis de Astrovirus**” se ha realizado bajo
nuestra dirección dentro del programa de doctorado “**Microbiología Ambiental
y Biotecnología (bienio 1998-2000)**” del Departamento de Microbiología de la
Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona, y que reúne los requisitos
necesarios para optar al título de **Doctor en Biología**.

Y para que así conste, firmamos la presente certificación con fecha 10 de
noviembre de 2004.

Dr. Albert Bosch i Navarro

Dra. Rosa M^a Pintó i Solé.

ÍNDICE

Índice	i
Agradecimientos.....	vii
Prólogo.....	xi
Abreviaturas y unidades.....	xv

1.- INTRODUCCIÓN	1
-------------------------	----------

1.1.- Aspectos generales.....	3
1.1.1.- Gastroenteritis víricas	3
1.1.2.- Astrovirus: Perspectiva histórica	4
1.2.- Características biológicas de los astrovirus.....	7
1.2.1.- Hospedadores naturales	7
1.2.2.- Morfología y estructura	8
1.2.3.- Taxonomía y clasificación	9
1.2.4.- Propagación <i>in vitro</i> en cultivos celulares	9
1.2.5.- Replicación, transcripción y traducción del genoma	10

1.2.6.-	Organización genómica	11
1.2.6.1.-	Poliproteína no estructural del ORF1a	13
1.2.6.2.-	Poliproteína no estructural del ORF1b	13
1.2.6.3.-	Poliproteína no estructural del ORF2	14
1.2.7.-	Procesamiento proteolítico de las diferentes poliproteínas	14
1.2.7.1.-	Proteínas no estructurales	14
1.2.7.2.-	Proteínas estructurales	15
1.2.8.-	Características físico-químicas	18
1.3.-	Aspectos clínicos de las infecciones por astrovirus.....	19
1.3.1.-	Transmisión, patogénesis y sintomatología	19
1.3.2.-	Epidemiología	20
1.3.3.-	Inmunidad	21
1.3.4.-	Tratamiento y control de la enfermedad	22
1.4.-	Técnicas de detección y diagnóstico de astrovirus.....	25
1.4.1.-	Microscopía electrónica	25
1.4.2.-	Ensayos inmunológicos	25
1.4.2.1.-	Inmunolectromicroscopía	25
1.4.2.2.-	Ensayos inmunoenzimáticos	26
1.4.2.3.-	Ensayos de aglutinación	26
1.4.3.-	Inmunofluorescencia	26
1.4.4.-	Métodos moleculares	27
1.4.4.1.-	Hibridación específica de ácidos nucleicos	27
1.4.4.2.-	RT-PCR	27
1.4.4.2.1.-	RT-PCR genéricas	28
1.4.4.2.2.-	RT-PCR específicas de serotipo	29
1.4.4.3.-	RT-PCR a tiempo real	29
1.4.4.4.-	Métodos moleculares combinados	30
1.4.4.4.1.-	Infección en cultivo celular y RT-PCR: <i>CC – RT-PCR</i>	30
1.4.4.4.2.-	Infección en cultivo celular y microscopía de fluorescencia	30
1.4.4.4.3.-	RT-PCR y polimorfismo de longitud De fragmentos de restricción: <i>RT-PCR – RFLP</i>	31

1.4.5.-	Secuenciación de ácidos nucleicos	31
1.5.-	Baculovirus: Vectores de expresión génica heteróloga.....	33
1.5.1.-	Baculovirus: Perspectiva histórica	33
1.5.2.-	Características biológicas	34
1.5.2.1.-	Morfología y estructura	34
1.5.2.2.-	Taxonomía y clasificación	35
1.5.2.3.-	Replicación, transcripción y traducción del genoma	35
1.5.3.-	Los baculovirus como vectores de expresión génica heteróloga	36
<hr/>		
2.-	OBJETIVOS	39
<hr/>		
3.-	ESTUDIO I: Cuantificación de astrovirus por RT-PCR competitiva. Aplicación en un estudio epidemiológico	43
<hr/>		
3.1.-	Antecedentes.....	45
3.2.-	Materiales y Métodos.....	47
3.2.1.-	Virus y líneas celulares	47
3.2.2.-	Purificación de astrovirus en gradientes de sacarosa	47
3.2.3.-	Determinación del número de partículas víricas	48
3.2.4.-	Construcción de un control interno de ARN	49
3.2.5.-	RT-PCR competitiva	52
3.2.6.-	Preparación de muestras fecales	54
3.3.-	Resultados.....	55
3.3.1.-	Purificación de astrovirus en gradientes de sacarosa	55
3.3.2.-	Validación de la RT-PCR competitiva	57
3.3.3.-	Cuantificación de astrovirus en muestras fecales	59
3.3.4.-	Análisis de los resultados según el serotipo	61
3.3.5.-	Análisis de los resultados según el genotipo	63
3.3.6.-	Fiabilidad de los resultados	64

3.3.7.- Resultados de las muestras con coinfección	66
3.3.8.- Correlación entre serotipo/genotipo y severidad de la gastroenteritis	67
3.4.- Discusión.....	69

4.- ESTUDIO II: Relación de la variabilidad de la proteína nsP1a/4 de astrovirus con la replicación del genoma vírico	75
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------

4.1.- Antecedentes.....	77
--------------------------------	-----------

4.2.- Materiales y Métodos.....	81
----------------------------------------	-----------

4.2.1.- Virus y líneas celulares	81
4.2.2.- Construcción de astrovirus recombinantes para la proteína nsP1a/4	81
4.2.3.- Determinación de la síntesis de ARN víricos	85
4.2.4.- Determinación de la producción de progenie vírica infecciosa	87
4.2.5.- Programas informáticos para el análisis de las proteínas nsP1a/4	87

4.3.- Resultados.....	89
------------------------------	-----------

4.3.1.- Obtención de astrovirus recombinantes para la proteína nsP1a/4	89
4.3.2.- Comparación de la síntesis de ARN víricos	93
4.3.3.- Comparación de la producción de progenie vírica infecciosa	95
4.3.4.- Análisis computacional de las proteínas nsP1a/4	96

4.4.- Discusión.....	101
-----------------------------	------------

5.- ESTUDIO III: Ensamblaje de partículas <i>virus-like</i> (VLPs) de astrovirus como modelo de la morfogénesis viral	107
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------

5.1.- Antecedentes..... 109

5.2.- Materiales y Métodos.....113

5.2.1.- Virus y líneas celulares	113
5.2.2.- Construcción de baculovirus recombinantes	113
5.2.3.- Expresión de proteínas recombinantes	117
5.2.4.- Purificación de VLPs en gradientes de sacarosa y de CsCl	118
5.2.5.- Microscopía electrónica de transmisión	119
5.2.6.- Desensamblaje y reensamblaje de VLPs	120
5.2.7.- Inmunoprecipitación	120
5.2.8.- Programas informáticos para el análisis de la poliproteína estructural	121

5.3.- Resultados.....123

5.3.1.- Análisis de los productos de expresión	123
5.3.2.- La expresión del ORF2, Δ ORF2 ó GFP Δ ORF2 conduce a la formación de VLPs	125
5.3.3.- Desensamblaje y reensamblaje de VLPs	130
5.3.4.- Caracterización antigénica y bioquímica de las VLPs y los anillos de 16 nm	134

5.4.- Discusión.....137

6.- CONCLUSIONES	143
-------------------------	------------

7.- APÉNDICE I: Material y Métodos	149
7.1.- Líneas celulares y Virus.....	151
7.1.1.- Líneas celulares	151
7.1.2.- Virus	153
7.2.- Infecciones víricas.....	154
7.2.1.- Astrovirus	154
7.2.2.- Baculovirus	155
7.3.- Ensayo inmunoenzimático (E.L.I.S.A.) de captura.....	158
7.4.- Extracción de ácidos nucleicos.....	159
7.5.- <i>Dot blot</i> e hibridación molecular de ácidos nucleicos.....	161
7.5.1.- <i>Dot blot</i>	161
7.5.2.- Hibridación molecular de ácidos nucleicos	162
7.6.- RT-PCR.....	164
7.7.- Electroforesis de ADN.....	166
7.8.- Secuenciación de ácidos nucleicos.....	167
7.9.- Purificación de ADN de bajo peso molecular.....	168
7.10.- Transformación de células <i>E. coli</i> competentes.....	169
7.11.- Transcripción <i>in vitro</i>	169
7.12.- Inmunofluorescencia.....	170
7.13.- Transfección de células Sf9 con <i>Bacmid</i> [®] recombinantes.....	172
7.14.- Electroforesis SDS-PAGE, Tinción con Azul de Comassie y <i>western blot</i>	173
8.- APÉNDICE II: Bibliografía	177
9.- APÉNDICE III: Publicaciones	199

AGRADECIMIENTOS

Cuando la escritura de la memoria de la tesis está próxima a su fin, llega el momento de sentarse delante del ordenador, y echando la vista hacia atrás, hacer balance de lo que ha significado en mi vida el proyecto que está a punto de culminarse.

Parece que fue ayer, pero ya hace 7 años que un chaval sin haber acabado la carrera se presentó a Albert y Rosa y les preguntó si podía formar parte de su grupo como colaborador en los ratos libres de que disponía entre clase y clase.

Siete años es un periodo de tiempo suficientemente importante como para marcar la vida de una persona, y sobretodo a nuestra edad. Durante todo este tiempo he vivido experiencias de todo tipo, pero cuando ves que los objetivos propuestos están a punto de cumplirse, resulta más fácil acordarse sólo de los buenos momentos y de cómo salí adelante frente a las adversidades.

A nivel profesional no cabe duda que estos siete años han servido para madurar como científico, para “pensar” como un científico; con lo que considero que uno de los objetivos ha sido cumplido con éxito. Comencé en un banco de dudas e indecisiones, y creo que ahora consigo enfrentarme a las situaciones con decisión y criterio, a lo mejor unas veces correcto y otras incorrecto, pero a fin de cuentas con un criterio propio.

En estos momentos es cuando me doy cuenta que esta tesis doctoral no sólo ha servido para formarme a nivel profesional; si no que la convivencia y la ayuda mutua entre personas han sido valores que he alimentado hasta tal nivel que sin ellos,

quizás, ni sería como soy, ni estaría escribiendo estas líneas. No podía encuadernar esta memoria sin reservar unas líneas para agradecer a todas las personas que me han apoyado y han estado a mi lado durante estos siete años, y que seguro que las tendré a mi lado cuando las vuelva a necesitar.

En primer lugar, agradecer a Albert y a Rosa por haberme dado la oportunidad de formar parte de su grupo y hacer posible la realización de un proyecto tan importante como una tesis doctoral. Les quiero agradecer su tiempo, apoyo, y por hacerme partícipe de infinidad de experiencias dentro y fuera del campo de la virología tanto a nivel profesional como personal. También quiero agradecer a Jean, junto a todo su grupo, su hospitalidad y atención durante los días que pasé en su laboratorio y que fueron una lanzadera para llevar a cabo de esta tesis.

A todos los compañeros que han pasado por el “lab 6”, pero en especial al póquer de amigos que se ha fraguado entre esas cuatro paredes: Xavi, Susana, Glòria y Cris. Empezaron siendo compañeros de laboratorio, no tardamos mucho tiempo en hacernos amigos dentro y fuera del “lab”, y finalmente han pasado a formar parte de ese grupo selecto de personas a quienes puedes confiar lo máspreciado que uno posee. Durante siete años hemos compartido el día a día del laboratorio, alegrías y tristezas, diversiones y penas; pero siempre hemos estado juntos para salir adelante. Xavi fue mi referencia en los inicios. Él me enseñó a “mimar” a las células y a “amaestrar” a los virus. Es de las personas que saben escuchar y que ayudan sin hacer ruido, sin un no por respuesta, sin esperar nada a cambio. Hoy en día, nuestra complicidad nos permite comunicarnos con una mirada, casi sin palabras, y esto lo dice todo. Susana fue, es y será mi referente en el mundo de los astrovirus, pero sobretudo un símbolo de compañerismo y amistad. Será imposible olvidar esas extracciones de ARN maratonianas en la vitrina vertical a treinta y cinco grados de temperatura; ¡vaya currada!, pero siempre teníamos algún tema de que hablar. En el “lab” hemos unidos esfuerzos para luchar juntos contra los “astros”, pero además, fuera del trabajo, hemos tenido la suerte de coincidir en muchos aspectos como deportes, música y viajes; y esto sólo ha hecho más que reforzar nuestra amistad. Que decir de Gloria, dentro del “lab” nos ha hecho disfrutar con su desorden controlado, con su despiste desenfrenado y con su entrañable “cleptomanía” (¿cuántos bolis tienes en el bolso?); pero fuera del “lab”, a parte de acentuar estas propiedades, hemos compartido inolvidables momentos como incomprensibles caídas esquiando y algún que otro cotilleo y culebrón. Y como no, Cris, con quien he compartido poyata durante todo este tiempo, manteniendo luchas encarnizadas por invadir un centímetro

del oponente. Ha sido la responsable de dotar al grupo de esa dosis de locura sana necesaria para desconectar puntualmente de situaciones tensas, pero lo mejor de ella lo ha mostrado fuera del “lab”, donde da riendas sueltas a su locura. ¿Cuántas han sido las historietas explicadas alrededor de una mesa que nos han hecho llorar de risa?. Sencillamente entrañable. Gracias a los cuatro y a las parejas que han tenido que soportar todas nuestras batallitas: Marta, Pep, Jorge y David.

No quiero olvidarme de aquellas personas que también formaron parte de este grupo como Àngels, Patri, Xantal, Piotrek, Dora, Waled, Núria y Héctor; y cómo no, a nuestro relevo, por su savia fresca, a quien ofrezco todo mi ánimo y ayuda. A vosotros Mary, Lluís, Frank, Islem, Unai, Cris y Núria.

También quería agradecer al resto del Departamento de Microbiología su apoyo, y como no quiero olvidarme de nadie, valga este agradecimiento para toda la gente que me conoce y que no nombro en las siguientes líneas.

A la gente del “lab 4”, mi “segundo lab”, por haber compartido conmigo los descansos para comer, reactivos, aparatos, y las cenas y fiestas departamentales; y sobretodo por ser mis amigos. Gracias, Rosa, Sonia, Nuria, Nacho, Paytu, Eli, Eva y Cristina; y a ti Óscar, aunque no seas del “lab 4”.

A los “Micromachines”, que aunque no hayamos ganado muchos títulos (o ninguno), me han hecho disfrutar del fútbol en compañía de amigos.

Mi más sincero agradecimiento y cariño a toda mi familia, es especial a mi madre y a mi hermano quienes me han apoyado desde el inicio de este proyecto y me han ayudado a sobreponerme a los malos momentos. Un recuerdo muy especial para mi padre, a quien dedico junto a mi madre, esta tesis, y que estoy seguro que desde donde me esté viendo estará muy orgulloso de mí. Yo no he hecho nada más que seguir los pasos que mi padre y mi madre me marcaron con su educación; y vistos los resultados, no cabe duda que acertaron. Al resto de familiares (abuelos, tíos, primos, suegros, cuñados, ...) por estar a mi lado.

Finalmente, GRACIAS a ti Mire. Esta tesis también va dedicada a ti. No tengo ningún tipo de duda que este proyecto ha llegado a su fin gracias a tu apoyo, y te considero como parte activa en su realización. Juntos hemos disfrutado y compartido con el resto de gente los buenos momentos; pero también has sido a quien han golpeado más

directamente los malos momentos. Has tenido que soportar mis bajadas de ánimos, mis cambios de carácter, mis preocupaciones; y sin embargo tu respuesta siempre ha sido ayudarme a salir del bache y mirar hacia delante con optimismo y transmitiéndome fuerza. Los agradecimientos se quedan cortos para poder devolverte todo lo que me has dado y como te has entregado, pero espero que poco a poco te pueda corresponder.

A todos por hacerme sentir tan feliz y poder disfrutar de vuestra amistad.

PRÓLOGO

Cuando nos adentramos en el mundo de los astrovirus, es mucha la información acumulada desde que fueron descubiertos hace casi 30 años; pero en comparación con lo que se conoce de otros virus causantes de gastroenteritis como rotavirus, es mucho el camino que queda por recorrer.

En el campo de la virología, con los avances tecnológicos, los estudios se especializan más en aspectos muy concretos de los virus, y a veces, se pierde la visión global de la biología de éste. Quizás por ello sorprenda el título de esta tesis doctoral, *Replicación y morfogénesis de astrovirus*; un título con una gran amplitud de posibilidades que, sin embargo, no pueden ser abarcadas en su totalidad con la realización de esta tesis doctoral. Pero en este caso, a pesar que se han estudiado aspectos muy específicos de la biología de los astrovirus, también se ha procurado encuadrarlos dentro de los conocimientos ya existentes y desde un punto de vista más globalizador.

En este contexto, la memoria de esta tesis doctoral comienza con un primer bloque introductorio que pretende asentar los conceptos básicos de los que se nutrieron los estudios específicos sobre la replicación y morfogénesis de astrovirus realizados a lo largo de este proyecto.

A continuación, la memoria se estructura en dos bloques principales: estudios relacionados con la replicación (Estudios I y II) y con la morfogénesis (Estudio III) de astrovirus.

En primer lugar, nos propusimos determinar las cargas víricas excretadas en las heces de niños con gastroenteritis causados por astrovirus con el fin de darnos una idea de cual era la capacidad replicativa de estos virus en su huésped natural. Para ello, se puso a punto una técnica molecular para la cuantificación de virus y se aplicó en un estudio epidemiológico realizado con anterioridad en el área metropolitana de Barcelona entre los años 1998 y 2002. El resultado obtenido fue que los niveles de carga vírica detectados eran diferentes en función del serotipo o genotipo del virus (Estudio I).

En segundo lugar, espoleados por los resultados obtenidos en el primer estudio y por los trabajos ya existentes, decidimos profundizar en el papel de la proteína nsP1a/4 de astrovirus en la replicación del genoma vírico y en la producción de progenie vírica. Estudios previos ya apuntaban hacia esta relación, aunque en ningún caso existían pruebas fehacientes. De este modo, la estrategia a seguir fue construir diferentes clones de astrovirus que sólo se diferenciasesen en la zona codificante para la proteína nsP1a/4 y estudiar la síntesis de los diferentes ARN víricos y producción de progenie vírica en cultivo celular. Los resultados obtenidos confirmaron nuestras hipótesis, las diferencias en la secuencia de la proteína nsP1a/4 se traducen en una capacidad de replicación del genoma vírico y de producción de progenie vírica diferencial entre diferentes genotipos del virus. Además, los resultados fueron coincidentes con los obtenidos en el estudio anterior sobre muestras fecales de origen humano (Estudio II).

Los datos obtenidos en estos dos estudios pueden ser importantes a la hora de decidir una estrategia en el tratamiento de las gastroenteritis causadas por astrovirus en función del serotipo o genotipo del virus, así como si la puesta a punto de una vacuna frente astrovirus estuviese justificada.

Finalmente, los pocos trabajos, y al mismo tiempo contradictorios, realizados sobre la morfogénesis de astrovirus, nos animó a profundizar un poco más en su estudio. Los trabajos de morfogénesis son complicados debido a que requieren gran cantidad de material, y para algunos virus, esto es difícil de conseguir *in vivo* e *in vitro*.

En nuestro caso, la estrategia seguida fue obtener partículas “*virus-like*” (VLPs) y trabajar con ellas como modelo del virus. Nuestro trabajo se centró en estudiar la importancia del extremo amino-terminal de la poliproteína estructural en el ensamblaje de la cápsides así como el papel de los iones divalentes en la estabilidad de las cápsides. Los resultados mostraron que a pesar que el extremo amino-terminal no es

imprescindible, éste no es eliminado en el ensamblaje de las cápsides. Además se constató la presencia de un estado intermedio (anillos de 16 nm) en el ensamblaje de las cápsides que se obtenía en grandes cantidades cuando las VLPs eran desestabilizadas por la presencia de quelantes de iones divalentes (Estudio III).

ABREVIATURAS Y UNIDADES

A continuación se listan las abreviaturas y unidades más utilizadas en este trabajo. Para las abreviaturas, en algunos casos se indica sólo su significado en inglés y en otros casos su significado en inglés y su traducción al castellano.

°C	Grados Celsius
aa	Aminoácido
Acc. Nº	<i>Accession Number</i> (número de acceso en el <i>GenBank</i>)
AcNPV	<i>Autographa californica</i> nucleopolyhedrovirus
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
ANOVA	<i>Analysis of variance</i> (análisis de la varianza)
APS	<i>Ammonium persulfate</i> (persulfato de amonio)
ARN	Ácido ribonucleico
ATCC	<i>American Tissue Culture Collection</i>
bd	Bidestilada
CaCo-2	Carcinoma de colon - 2 (línea celular eucariota de origen humano)
CC	Cultivo celular
col.	Colaboradores
CsCl	<i>Cesium chloride</i> (cloruro de cesio)
CSPD	<i>Disodium 3-(4-methoxyspiro{1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro)tricyclo [3.3.1.1^{3,7}]decan}-4-yl) phenyl phosphate</i>
Δ	Truncado
DAPI	4'-6-diamina-2'-fenilindol clorohidrato
dNTP	<i>Desoxiribonucleotide triphosphate</i> (desoxirribonucleótido trifosfato)

D.O.	Densidad óptica
DTT	<i>Dithiothreitol</i>
EDTA	<i>Ethilen-diamine-tetraacetic acid</i>
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i> (ensayo inmunoenzimático)
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperacinetanosulfónico
HAstV	<i>Human astrovirus</i> (astrovirus humano)
HVR	<i>Hipervariable region</i> (región hipervariable)
ICTV	<i>International Comitee for Taxonomy of Viruses</i>
IEM	Inmunolectromicroscopía
IF	Inmunofluorescencia
IgG	Inmunoglobulina G
IP	Inmunoprecipitación
IPTG	<i>Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyraniside</i>
IRE	<i>Immunoreactive epitope</i> (epítipo inmunoreactivo)
λ	longitud de onda
LB	<i>Luria broth</i>
\log_{10}	logaritmo en base 10
LSD	<i>Least significant difference</i> (diferencia significativa mínima)
MAb	<i>Monoclonal antibody</i> (anticuerpo monoclonal)
MEM	<i>Minimal essential medium</i> (medio mínimo esencial)
MET	Microscopía electrónica de transmisión
mF	miliFaradio
M-MLV	<i>Moloney murine leukaemia virus</i>
m.o.i.	<i>Multiplicity of infection</i> (multiplicidad de infección)
NBT	<i>Nitroblue tetrazolium chloride</i>
NLS	<i>Nuclear localization signal</i> (señal de localización nuclear)
nsP	<i>Non structural protein</i> (proteína no estructural)
ORF	<i>Open reading frame</i> (pauta abierta de lectura)
PAGE	<i>Polyacrylamide gel electrophoresis</i> (electroforesis en gel de poliacrilamida)
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (tampón fosfato salino)
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (reacción en cadena de la polimerasa)
PF	Parafolmaldehído
POL	Polimerasa
PRO	Proteasa
PTA	<i>Phosphotungstic acid</i> (ácido fosfotúngstico)

p/p	peso/peso
p/v	peso/volumen
RFLP	<i>Restriction fragment length polymorfism</i> (polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción)
RFS	<i>Ribosomal frameshifting</i>
RNasa	Ribonucleasa
rNTP	<i>Ribonucleotide triphosphate</i> (ribonucleótido trifosfato)
RT	<i>Reverse-transcriptase</i> (retrotranscriptasa reversa)
SDS	Sodio-dodecil-sulfato
Sf9	<i>Spodoptera frugiperda</i> 9 (línea celular de mariposa)
SFB	Suero fetal bovino
SFBi	SFB inactivado
SPIEM	<i>Solid phase immunoelectromicroscopy</i>
TEMED	N,N,N',N'-tretametil-etilendiamina
TM	<i>Transmembrane helices</i> (dominio transmembrana)
TN	Tris-NaCl
TNE	Tris-NaCl-EDTA
u	unidad
UI	Unidades internacionales
UFC	Unidades formadoras de calvas
UTR	<i>Untranslated region</i> (región no traducida)
UV	Ultravioleta
V	Voltio
VLP	<i>Virus-like particle</i> (partícula <i>virus-like</i>)
VP	<i>Viral protein</i> (proteína vírica, normalmente estructural)
v/v	volumen/volumen
WB	<i>Western blot</i>

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ASPECTOS GENERALES

1.1.1. Gastroenteritis Víricas

Los principales agentes infecciosos implicados en gastroenteritis víricas en humanos son los rotavirus, adenovirus entéricos, calicivirus y astrovirus (Wilhelmi y col., 2003).

Entre todos ellos, los que presentan una mayor relevancia médica en los países desarrollados son los rotavirus debido a su elevada prevalencia y al consecuente impacto económico por lo que se refiere a atención sanitaria (casi dos millones de casos tratados al año) y a hospitalizaciones (más de 200.000 al año). Estos datos justificaron los esfuerzos realizados en el desarrollo de una primera vacuna atenuada frente rotavirus en 1998 (RotaShield, Wyeth-Lederle, USA). Lamentablemente, la vacuna fue retirada del mercado nueve meses después de empezar a ser administrada debido a su posible asociación con efectos secundarios de intususpección.

A nivel de los países en vías de desarrollo las cifras se multiplican por diez, y las gastroenteritis causadas por rotavirus suponen una de las primeras causas de mortalidad infantil debido a problemas de deshidratación ya que no pueden ser tratadas a nivel hospitalario por falta de infraestructuras. Se calcula que un número superior a 500.000 niños menores de 5 años mueren al año debido a gastroenteritis causadas por rotavirus (Parashar y col., 2003).

Los rotavirus son miembros de la familia *Reoviridae*, virus icosaédricos de unos 70 nm de diámetro y sin envuelta lipídica. La cápside está compuesta por tres capas proteicas dispuestas concéntricamente, y su genoma consta de 11 moléculas de ARN bicatenario.

A mucha distancia de los rotavirus se encuentran el resto de virus citados con anterioridad. Aún así, no sería una postura inteligente infravalorar la repercusión de las gastroenteritis causadas por éstos últimos tanto a nivel médico como económico.

Los adenovirus pertenecen a la familia *Adenoviridae*. Se trata de virus icosaédricos de unos 70 nm de diámetro, sin envuelta lipídica, con un genoma de ADN bicatenario y con unas características espículas que sobresalen de su superficie. Especialmente los adenovirus entéricos tipo 40 y 41 son importantes agentes infecciosos causantes de gastroenteritis en la población infantil.

Los calicivirus pertenecen a la familia *Caliciviridae*, en la que se agrupan los géneros *Norovirus* y *Sapovirus*. Son virus icosaédricos de unos 27-40 nm de diámetro, sin envuelta lipídica y con una molécula de ARN monocatenario de polaridad positiva como genoma. Fueron los primeros agentes víricos asociados a gastroenteritis (Kapikian y col., 1972) y se consideran la primera causa de brotes de gastroenteritis víricas en adultos, aunque no se puede obviar su prevalencia en niños.

1.1.2. Astrovirus: Perspectiva Histórica

Los astrovirus fueron identificados por primera vez como agentes infecciosos causantes de gastroenteritis en el año 1975 durante la investigación de un brote de diarrea y vómitos entre los niños de una sala de maternidad (Appleton y Higgins, 1975). La observación de muestras de heces de niños enfermos bajo el microscopio electrónico en busca de un agente causal puso de manifiesto la presencia de unas partículas víricas de morfología distinta a otros virus conocidos hasta el momento asociados con gastroenteritis como rotavirus o calicivirus.

El término astrovirus fue propuesto meses más tarde a su descubrimiento por Madeley y Cosgrove (1975). El nombre de astrovirus deriva de la palabra “astron”, que significa estrella en griego, y hace referencia a su característica estructura estrellada presente en la superficie de la cápside.

Un paso muy importante que abrió muchas puertas a un mejor conocimiento de los astrovirus lo dieron Lee y Kurtz en 1981 cuando consiguieron aislar y propagar con éxito una cepa de astrovirus humano en células HEK (células embrionarias de riñón de origen humano). Este hecho permitió la identificación de cinco serotipos diferentes de astrovirus en 1984 (Kurtz y Lee, 1984), y la obtención de anticuerpos monoclonales que permitieron poner

a punto sistemas de diagnóstico por inmunoensayo (Herrmann y col, 1988; y Herrmann y col., 1990). Posteriormente se identificaron dos nuevos serotipos (Lee y Kurtz, 1994).

A partir de la década de los 90 se confirmó la importancia clínica de los astrovirus como agentes causantes de gastroenteritis víricas en niños a raíz de numerosos estudios epidemiológicos basados en un principio en la microscopía electrónica y en ensayos inmunológicos, y más adelante en el desarrollo de múltiples técnicas de detección por amplificación de ácidos nucleicos.

La secuenciación completa del primer genoma de astrovirus se consiguió en 1993 (Jiang y col., 1993) y la construcción del primer clon de ADNc del genoma completo del astrovirus serotipo 1 se realizó en 1997 (Geigenmüller y col., 1997).

En el 2000, Méndez-Toss y col. pusieron de manifiesto la existencia de un nuevo serotipo (HAstV-8).

1.2. CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS DE LOS ASTROVIRUS

1.2.1. Hospedadores Naturales

A parte de tener como hospedador natural al hombre, los astrovirus también se han asociado etiológicamente con varias enfermedades en diversas especies de animales que incluyen tanto mamíferos como aves (Woode y Bridger, 1978; Snodgrass y col., 1979, Williams, 1980; Hoshino y col., 1981; Shimizu y col., 1990; Englund y col., 2002; y Jonassen y col., 2003).

En la mayoría de especies, las infecciones por astrovirus afectan al aparato gastrointestinal, pero en aves también se han descrito otras enfermedades como la nefritis intersticial aguda y el retraso del crecimiento en pollos (Imada y col., 1979), hepatitis en patos (Gough y col., 1984) y la enfermedad llamada *poult enteritis and mortality syndrome* en pavos (Koci y col.; 2000). Todas estas enfermedades pueden llegar a causar una gran pérdida económica para la industria avícola.

Los astrovirus parecen tener una elevada especificidad de género ya que nunca se han descrito casos de transmisión interespecífica ni de reacción cruzada de los anticuerpos específicos frente a astrovirus que afectan a diferentes especies animales (Tzipori y col., 1981; y Harbour y col., 1984).

Sin embargo, estudios filogenéticos basados en el grado de similitud de las secuencias de las proteínas de la cápside sugieren la posibilidad de que algún día existieran casos de zoonosis (Jonassen y col., 2001). Actualmente se postula que la introducción de los astrovirus en la

población humana fue debida a una única transmisión del virus proveniente de una única especie animal (Lukashow y Goudsmit, 2002).

1.2.2. Morfología y Estructura

Los astrovirus son virus pequeños, sin envuelta lipídica, de simetría icosaédrica y con un genoma compuesto por una cadena de ARN monocatenario de polaridad positiva. Su principal característica morfológica es su apariencia estrellada.

Como regla general, se considera que tienen un diámetro de 28 nm, aunque puede variar en función del origen del virus (heces o cultivo celular), del método de purificación y del modo de preparación de la muestra para su observación bajo el microscopio electrónico. Del mismo modo, su característica estructura estrellada sólo se observa en un 10% de los viriones presentes en una preparación.

Estudios de ultraestructura del astrovirus serotipo 2 realizados por Risco y col. en 1995 mostraron que los virus presentan unas espículas protuberantes en la superficie haciendo que el diámetro total del virión alcance los 41 nm, mientras que si no se consideran dichas espículas, el diámetro del virión es de unos 30 nm. Además, comprobaron que el tratamiento alcalino de la muestra induce la aparición de la morfología estrellada en los viriones.

Posteriores estudios de crioelectromicroscopía demostraron que las partículas del astrovirus serotipo 1 constan de una cápside central de 33 nm de diámetro decorada con 30 espículas diméricas que se extienden 5 nm desde la superficie de la cápside dando un tamaño total de la partícula vírica de 43 nm (Matsui y Greenberg, 2001a) (Figura 1.1).

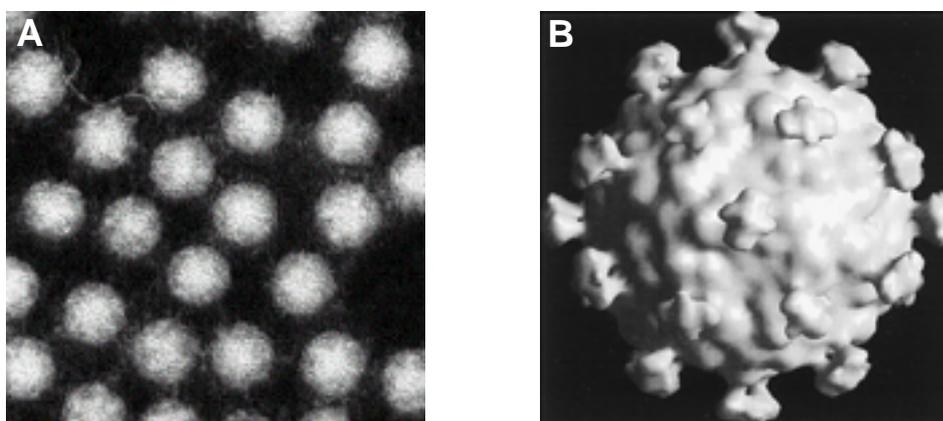


Figura 1.1: A: Inmuno-electromicroscopía de astrovirus. B: Reconstrucción tridimensional del astrovirus serotipo 1 (Yeager; Fields Virology, 4th edition, 2001).

1.2.3. Taxonomía y Clasificación

Los astrovirus pertenecen a la familia *Astroviridae*, dentro del *subphylum* de virus de ARN monocatenario de polaridad positiva (van Regenmortel y col., 2000).

El análisis de las proteínas y ARNs sintetizados durante la infección de cultivos celulares con astrovirus inclinó la balanza hacia la postura de no incluir estos virus dentro de ninguna de las dos familias de virus con ARN monocatenario de polaridad positiva establecidas hasta el momento, *Picornaviridae* y *Caliciviridae* (Monroe y col., 1991).

Estudios posteriores pusieron de manifiesto la presencia de un ARN subgenómico, de una señal de *ribosomal frameshifting* (RFS) y de un motivo de ARN polimerasa ARN dependiente, así como la falta de un dominio helicasa (Jiang y col., 1993; Monroe y col., 1993; y Lewis y col., 1994).

Todos estos datos, junto con la disponibilidad de la secuencia completa del genoma (Jiang y col., 1993), permitieron establecer una organización genómica propia para estos virus, y en 1995 el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV) clasificó los astrovirus dentro de una familia nueva, la familia *Astroviridae*.

Actualmente, la ICTV propone la bifurcación de la familia *Astroviridae* en dos géneros: *Mamastrovirus* (astrovirus de mamíferos) y *Avastrovirus* (astrovirus de aves).

Hasta la fecha se han descrito 8 serotipos de astrovirus humano.

A modo de resumen, las características principales de astrovirus se detallan en la Tabla 1.1.

1.2.4. Propagación *In Vitro* en Cultivos Celulares

Dos años después del descubrimiento de los astrovirus, Lee y Kurtz (1977) demostraron por inmunofluorescencia que los astrovirus presentes en heces de enfermos eran capaces de infectar células primarias embrionarias de riñón de origen humano (línea celular HEK). Sin embargo no fue hasta 1981 que consiguieron hacer propagar el virus en las líneas celulares PBK y LLCMK2 de origen primate tras múltiples pases a ciegas en la línea celular HEK y con la incorporación de tripsina en el medio de cultivo.

Tabla 1.1: Características principales de los astrovirus

Estructura

- Partículas icosaédricas de 28-43 nm de diámetro.
- Sin envuelta lipídica.

Genoma

- ARN monocatenario de polaridad positiva de ~ 7 kb y poliadenilado.
- Organización genómica en tres ORFs: ORF1a y ORF1b (proteínas no estructurales) y ORF2 (proteínas estructurales).
- Presencia de una señal de RFS entre ORF1a y ORF1b.
- Falta de dominio de helicasa.
- Utilización de un ARN subgenómico de ~ 2.8 kb para la síntesis de las proteínas estructurales.
- El ARN transfectado en células CaCo-2 y BHK-21 es capaz de generar partículas víricas infecciosas.

Replicación

- Replicación citoplasmática.
 - Necesidad de utilizar tripsina para su propagación en cultivo celular.
-

En 1990, Willcocks y col. consiguieron hacer replicar cepas de astrovirus aisladas de heces directamente sobre la línea celular intestinal de origen humano CaCo-2, aunque siempre en presencia de tripsina.

Hoy en día, las dos líneas celulares más utilizadas para el aislamiento de astrovirus a partir de muestras fecales de enfermos con gastroenteritis son las líneas de origen humano CaCo-2 y PLC/PRF/5 (Willcocks y col., 1990; Pintó y col., 1996; y Taylor y col., 1997a). Del mismo modo, las líneas celulares más utilizadas para su propagación son CaCo-2, LLMCK2, T84 y HT-29.

1.2.5. Replicación, Transcripción y Traducción del Genoma

El esquema de replicación, transcripción y traducción propuesto para astrovirus deriva del bien caracterizado modelo de alphavirus. Los astrovirus presentan una organización genómica similar a la de alphavirus los cuales también sintetizan las proteínas estructurales de la cápside a partir de un ARN subgenómico (Schlesinger y Schlesinger, 1996).

A grandes rasgos, tras la entrada del virus en la célula y desencapsidación del genoma tiene lugar la síntesis de las proteínas no estructurales a partir del genoma vírico. Estas proteínas

transcriben el genoma dando lugar a un ARN de polaridad negativa (ARN anti-genómico) que sirve de molde para la síntesis de nuevos genomas así como de moléculas de ARN subgenómico de polaridad positiva el cual es traducido para dar lugar a las proteínas estructurales de la cápside.

Tras darse el ensamblaje del genoma dentro de las cápsides, los viriones salen al exterior de la célula donde maduran y son capaces de infectar células vecinas.

1.2.6. Organización Genómica

El genoma de astrovirus está compuesto por una molécula de ARN monocatenario de polaridad positiva de unas 7 kb de longitud y poliadenilado en el extremo 3' (Matsui y Greenberg, 2001a).

La molécula de ARN genómico, tanto extraída del virus como transcrita *in vitro* a partir del ADNc de un clon del genoma del virus, es capaz de producir virus infecciosos una vez ha sido transfectada a células no susceptibles a la infección por astrovirus como la línea celular BHK-21 ó a células susceptibles a la infección como la línea celular CaCo-2 (Geigenmüller y col., 1997).

Además del ARN genómico, durante el ciclo replicativo de astrovirus también se producen moléculas de ARN subgenómico de unas 2.8 kb de polaridad positiva a partir del extremo 5' del ARN anti-genómico. Este ARN subgenómico se utiliza para la síntesis de las proteínas estructurales de la cápside (Monroe y col., 1991).

El genoma de astrovirus se organiza en tres pautas de lectura abierta (ORF): ORF1a, ORF1b y ORF2 (Monroe y col., 1995).

Los ORF1a y ORF1b codifican para las proteínas no estructurales del virus, y el ORF2 codifica para las proteínas de la cápside a partir del ARN subgenómico (Figura 1.2.(A)).

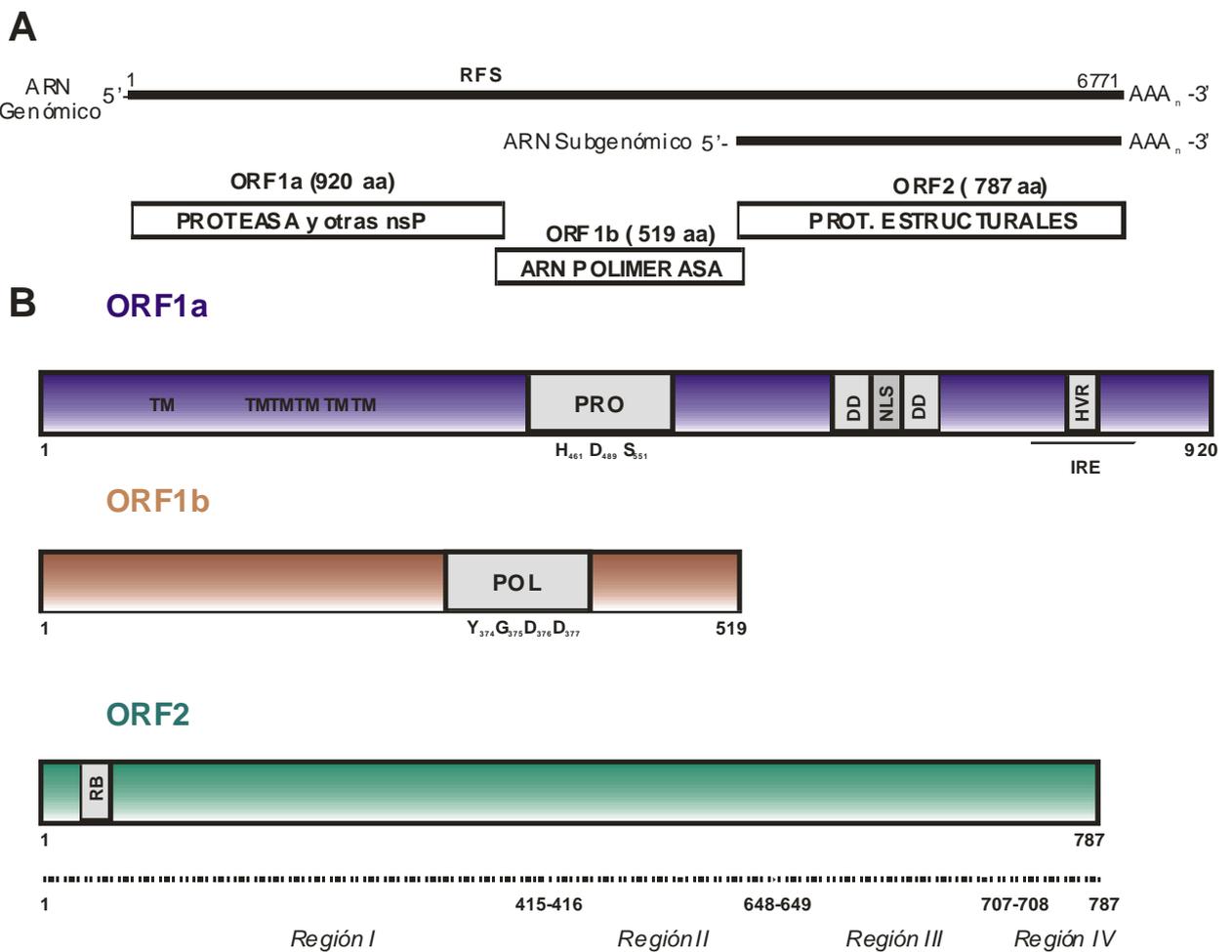


Figura 1.2: (A) Organización genómica del HAstV-1 (Acc. No. L23513); donde RFS: señal de *ribosomal frameshifting*. (B) Representación esquemática de los tres ORF destacando los motivos más característicos de cada uno de ellos; donde TM: dominio transmembrana; PRO: motivo de proteasa; DD: *death domain*; NLS: secuencia de localización nuclear; HVR: región hipervariable; IRE: epítipo inmunoreactivo; POL: motivo de ARN polimerasa; y RB: zona rica en residuos básicos.

El ORF1a está precedido por una secuencia no traducida (5'-UTR) de una longitud entre 80 y 85 bases dependiendo del serotipo.

En el ORF1a destaca un motivo *serine protease* y en el ORF1b un motivo de ARN polimerasa ARN dependiente. Entre el ORF1a y el ORF1b existe un solapamiento entre 61 y 73 bases según el serotipo (Figura 1.2.(A)).

El ORF2 codifica para una única poliproteína que da lugar a las diferentes proteínas de la cápside una vez se ha formado el virión. El solapamiento entre el ORF1b y el ORF2 es de 8 bases (Figura 1.2.(A)).

En el extremo 3' del genoma hay otra secuencia no traducida (3'-UTR) y una cola de una treintena de adeninas.

1.2.6.1. Poliproteína no estructural del ORF1a

La poliproteína codificada a partir del ORF1a (nsP1a) consta entre 920 y 935 aminoácidos según el serotipo de astrovirus (Figura 1.2.B).

En el extremo amino-terminal de la poliproteína se han identificado varios dominios transmembrana que pueden estar implicados en el anclaje del complejo de replicación del ARN vírico a membranas celulares (Jiang y col., 1993; y Jonassen y col., 2003).

En la parte central de la poliproteína se encuentra un motivo de proteasa viral perteneciente al grupo de las *3C-like serine proteases* que posee un elevado grado de homología con las proteasas de dos virus de la familia *Caliciviridae*: el virus de la enfermedad hemorrágica del conejo (RHDV, *rabbit hemorrhagic disease virus*) y el calicivirus felino (Jiang y col., 1993). La tríada catalítica está formada por los aminoácidos His₄₆₁, Asp₄₈₉ y Ser₅₅₁.

En el extremo carboxi-terminal se ha identificado la presencia de una señal de localización nuclear (NLS) aunque su significado biológico en el ciclo replicativo de astrovirus no está claro (Jiang y col., 1993). En esta zona de la poliproteína también se ha descrito la presencia de un epítipo inmunoreactivo (Matsui y col., 1993) y de un *death domain* relacionado con la activación del proceso de apoptosis en las células infectadas (Guix y col. 2004a).

Finalmente, cabe destacar la presencia de una región hipervariable (HVR) rica en inserciones y deleciones en el extremo carboxi-terminal y que en un principio se asoció a la adaptación de astrovirus a determinadas líneas celulares (Willcocks y col., 1994a) y más adelante se ha relacionado con un posible papel en la replicación del ARN vírico (Guix y col., 2004b),

1.2.6.2. Poliproteína no estructural del ORF1b

El ORF1b codifica para una poliproteína (nsP1b) de entre 515 y 519 aminoácidos dependiendo del serotipo de astrovirus (Figura 1.2.(B)).

En esta poliproteína principalmente destaca la presencia de un motivo de ARN polimerasa ARN dependiente perteneciente al supergrupo I según la clasificación de Koonin (Koonin, 1991), aunque aún no se ha caracterizado por completo. Se ha propuesto que el lugar activo de esta

ARN polimerasa correspondería a la secuencia aminoacídica Y₃₇₄G₃₇₅D₃₇₆D₃₇₇ altamente conservada en astrovirus humanos y animales (Carter y Willcocks, 1996).

A pesar de que el ORF1b posee un potencial codón de inicio de traducción, se ha demostrado que la síntesis de la poliproteína tiene lugar tras un fenómeno de *ribosomal frameshifting* que se produce en la región de solapamiento entre el ORF1a y el ORF1b. De este modo se forma una superproteína que engloba el ORF1a y el ORF1b (nsP1a/1b) (Jiang y col., 1993; Marczinke y col., 1994) y que es procesada posteriormente en las dos poliproteínas nsP1a y nsP1b.

1.2.6.3. Poliproteína estructural del ORF2

La poliproteína codificada por el ORF2 tiene un tamaño variable según el serotipo de astrovirus que oscila entre 782 y 796 aminoácidos (Figura 1.2.(B)).

En un estudio realizado por Wang y col. (2001), la secuencia del ORF2 fue dividida en cuatro regiones. La región I, que abarca la secuencia entre los aminoácidos 1 y 415, es la que está más conservada entre todos los serotipos del virus. En esta región existe una zona rica en residuos básicos que se ha relacionado con el empaquetamiento del ARN vírico (Geigenmüller y col., 2002b).

La región II (entre los aminoácidos 416 y 648) presenta un ligero grado de variabilidad entre los diferentes serotipos mientras que la homología dentro de cada serotipo es elevada. La región III (desde el residuo 649 al 707) es la zona con mayor grado de variabilidad entre los diferentes serotipos con presencia de inserciones y/o deleciones. Finalmente, la región IV (desde el residuo 708 al final) vuelve a presentar un elevado grado de similitud entre todos los serotipos.

1.2.7. Procesamiento Proteolítico de las Diferentes Poliproteínas

1.2.7.1. Proteínas no estructurales

Los ORF1a y ORF1b se traducen simultáneamente mediante un fenómeno de *ribosomal frameshifting* dando lugar a una superproteína de unos 160 kDa que posteriormente es procesada hasta dar lugar a las diferentes proteínas finales de las cuales no se sabe exactamente cuántas se generan, ni los lugares exactos de procesamiento. Tampoco se sabe si la teórica proteasa vírica es la responsable de los cortes ni si las proteasas celulares juegan un papel importante en dicho procesamiento proteolítico.

Actualmente, el modelo más aceptado para explicar el procesamiento de la superproteína nsP1a/1b es un compendio de resultados de diferentes estudios realizados con diferentes sistemas experimentales (Gibson y col., 1998; Willcocks y col., 1999; Geigenmüller y col., 2002a; Kiang y Matsui, 2002; y Méndez y col.; 2003).

Según este modelo, la superproteína de 160 kDa es procesada dando lugar a una ARN polimerasa ARN dependiente de unos 57 kDa (nsP1b) y una poliproteína de 102 kDa (nsP1a).

La proteína nsP1a es posteriormente procesada hasta dar lugar a cuatro proteínas finales (nsP1a/1, nsP1a/2, nsP1a/3 y nsP1a/4), aunque no se conoce con exactitud los lugares de corte (Figura 1.3). De las cuatro proteínas derivadas de la nsP1a, la nsP1a/3 corresponde a la putativa proteasa vírica de unos 28 kDa (Jiang y col., 1993) y la nsP1a/4 a una proteína de unos 24-26 kDa que podría estar relacionada con la replicación del ARN vírico (Guix y col., 2004b).

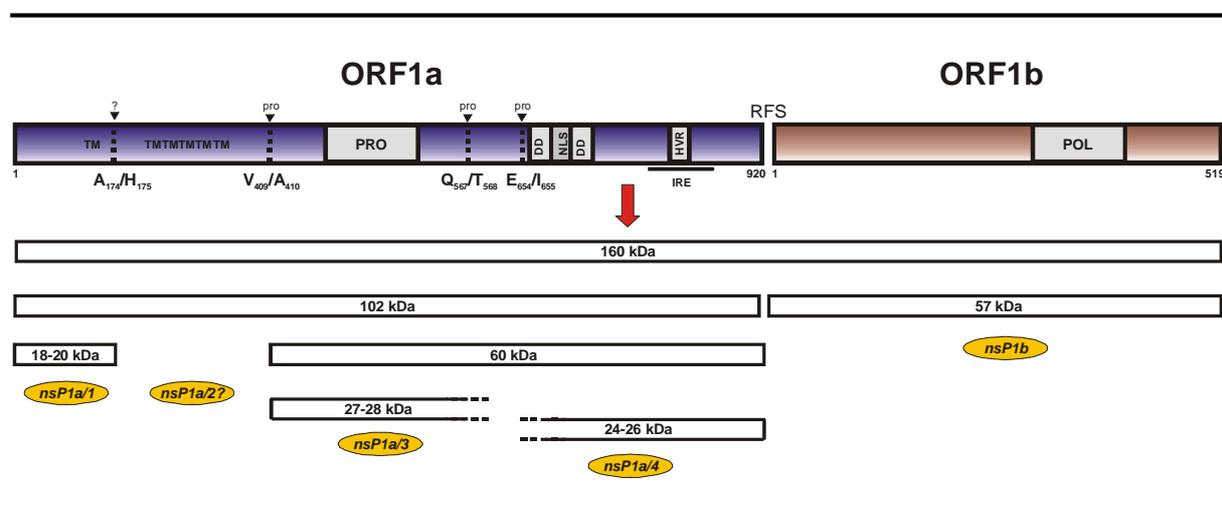


Figura 1.3: Modelo de procesamiento de las poliproteínas que da lugar a las proteínas no estructurales del virus (nsP) resultantes de la traducción del ORF1a y ORF1b. Los triángulos invertidos señalan posibles lugares de procesamiento proteolítico por la proteasa vírica (pro) o proteasas celulares (?); donde RFS: señal de *ribosomal frameshifting*; TM: dominio transmembrana; PRO: motivo de proteasa; DD: *death domain*; NLS: señal de localización nuclear; HVR: región hipervariable; IRE: epítipo inmunoreactivo; POL: motivo de ARN polimerasa.

1.2.7.2. Proteínas estructurales

A pesar de que ha sido uno de los temas más estudiados por diferentes grupos, el procesamiento de la poliproteína de 87-90 kDa obtenida por traducción del ORF2, así como el ensamblaje de las proteínas dando lugar a cápsides víricas, siguen siendo fuente de controversia y discusión.

En general, se considera que las cápsides víricas maduras e infecciosas están compuestas por tres proteínas mayoritarias con un tamaño de 35-32 kDa (VP34), 31-27 kDa (VP29) y 26-24 kDa (VP26) (Willcocks y col., 1990; Monroe y col., 1991; Belliot y col., 1997a; y Bass y Qiu; 2000). La VP34 está codificada a partir del extremo amino-terminal del ORF2 mientras que la VP26 parece ser una versión truncada por el extremo amino-terminal de la VP29 codificada a partir de la parte central del ORF2 (Sánchez-Fauquier y col., 1994; y Belliot y col., 1997a).

Son varios los modelos propuestos para explicar la formación de las cápsides víricas a partir de la poliproteína estructural (Bass y Qiu, 2000; Geigenmüller y col., 2002b; y Méndez y col., 2002). Todos ellos coinciden en que la poliproteína de 87-90 kDa es traducida a partir del ARN subgenómico y es esta poliproteína, o un primer producto de procesamiento intracelular, la que se ensambla en el interior de la célula dando lugar a cápsides víricas inmaduras y con baja infectividad. Sin embargo, los diferentes modelos difieren en cómo tiene lugar el procesamiento intracelular de la poliproteína previo al ensamblaje en cápsides víricas inmaduras (Figura 1.4).

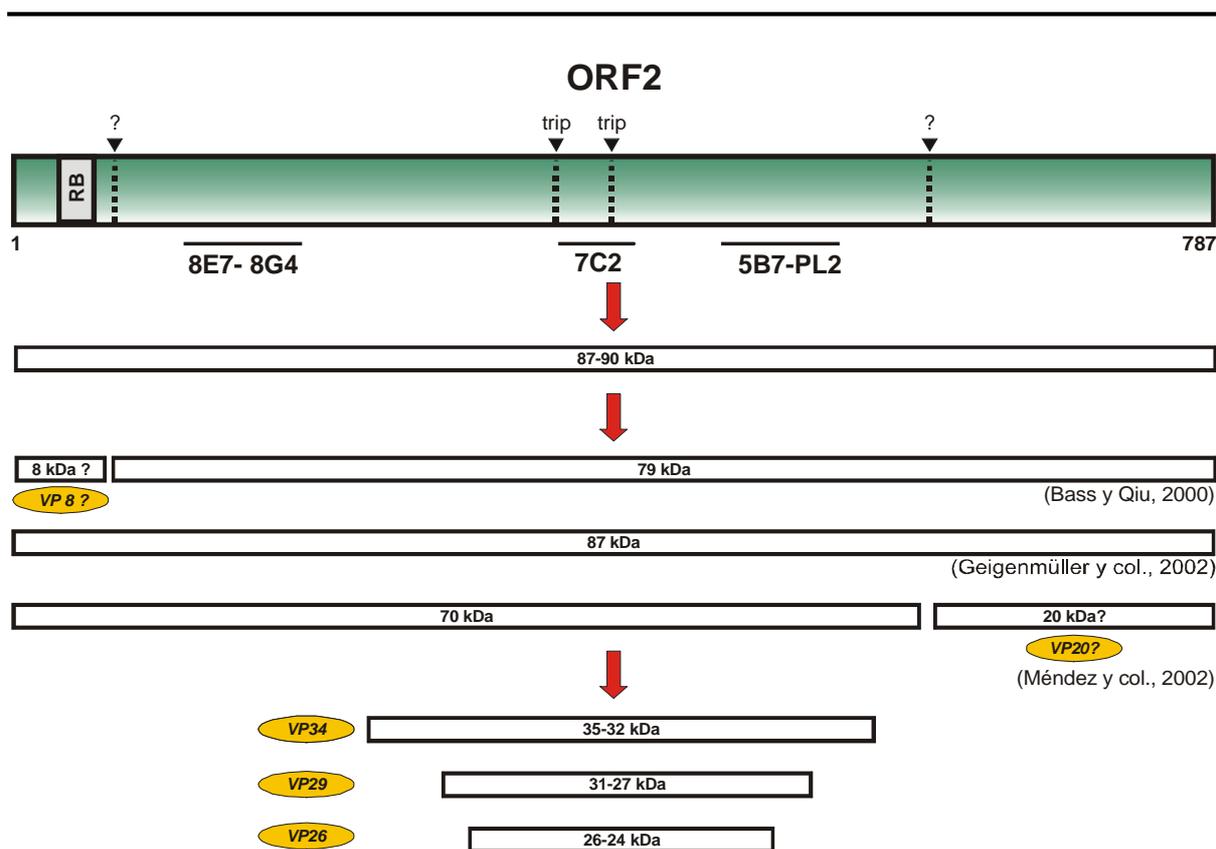


Figura 1.4: Modelos de procesamiento de la poliproteína resultante de la traducción del ORF2 que da lugar a las proteínas estructurales del virus (VP). Los triángulos invertidos señalan posibles lugares de procesamiento proteolítico por la proteasa vírica (pro) o proteasas celulares (?); donde RB: dominio rico en residuos básicos. También se mapan los lugares de reconocimiento de algunos de los diferentes anticuerpos monoclonales existentes frente la cápside del virus (8E7, 8G4, 7C2, 5B7 y PL2)

Para el astrovirus serotipo 1, Bass y Qiu (2000) propusieron que la poliproteína de 87 kDa era procesada por el extremo amino-terminal dando lugar a un precursor de 79 kDa a partir del cual tenía lugar el ensamblaje de las cápsides inmaduras.

Posteriormente, Geigenmüller y col. (2002) refutaron este modelo y propusieron que era directamente la poliproteína de 87 kDa traducida a partir del ARN subgenómico la que se estructuraba dando lugar a las cápsides víricas sin necesidad de un procesamiento proteolítico previo.

Finalmente, Méndez y col. (2002) propusieron, para el astrovirus serotipo 8, que la poliproteína de 90 kDa era procesada por el extremo carboxi-terminal resultando en una nueva poliproteína de 70 kDa que da lugar a las cápsides inmaduras.

Todos estos modelos convergen en la idea que estas cápsides inmaduras son liberadas al exterior de la célula y entonces la tripsina actúa sobre ellas dando lugar a las tres proteínas definitivas haciendo que el virión sufra un considerable incremento en su capacidad infectiva.

Entre los distintos anticuerpos monoclonales (MAb) que se han obtenido frente la cápside de astrovirus destacan el 8E7, 8G4, 7C2, 5B7 y PL2, aunque para ninguno de ellos se ha caracterizado exactamente cual es el epítipo que reconocen. El mapaje de estos anticuerpos monoclonales se ha llevado a cabo por diferentes aproximaciones experimentales (Matsui y col., 1993; y Geigenmüller y col., 2002b) y por análisis de patrones de hidrofobicidad de secuencias aminoacídicas (Wang y col., 2001).

Las principales características de estos anticuerpos quedan plasmadas en la Tabla 1.2.

Tabla 1.2: Características de los principales anticuerpos monoclonales frente a la cápside de astrovirus.

MAB	Serotipo	Epítipo	NT	Técnicas	Referencia
8E7	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8	VP34	NO	ELISA, IP, IF, WB, IEM	Herrmann y col. (1988)
8G4	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8	VP34	NO	ELISA, IP, IF	Bass y Upadhyayula (1997)
7C2	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7	VP29	SI	ELISA, IP, WB	Bass y Upadhyayula (1997)
5B7	1	VP26	SI	ELISA, IP, IF	Bass y Upadhyayula (1997)
PL2	2	VP26	SI	IP, IF, IEM	Bass y Upadhyayula (1997)

Donde MAB: anticuerpo monoclonal; NT: capacidad neutralizante; ELISA: ensayo inmunoenzimático; IP: inmunoprecipitación; IF: inmunofluorescencia; WB: *western blot*; IEM: inmunoelectromicroscopía.

1.2.8. Características Físico-Químicas

Los astrovirus son resistentes a pH ácidos (pH 3), desecación, cloroformo, una gran variedad de detergentes tanto no-iónicos como aniónicos y solventes lipídicos. Sin embargo, no resisten temperaturas elevadas durante largos períodos de tiempo (1 h a 50 °C ó 5 min a 60 °C), concentraciones de cloro libre superiores a 1 mg/l y ciclos de congelación / descongelación repetidos, aunque mantienen su integridad después de 10 años a temperaturas de -70 °C (Kurtz y Lee, 1987; Williams, 1989; Abad y col., 1997; y Abad y col, 2001).

Respecto a las densidades de flotación, han sido varios los autores que han descrito que al purificar una suspensión de astrovirus (ya sea proveniente de muestras fecales como de cultivo celular) en gradientes de CsCl, las partículas víricas se distribuyen típicamente en dos picos antigénicos con el mismo patrón proteico y con unas densidades de 1.37-1.35 g/ml y 1.33-1.32 g/ml respectivamente. La presencia de ARN del virus en el pico de mayor densidad, y su ausencia en el pico de menor densidad, sugiere que el primero corresponde a partículas víricas infecciosas, mientras que el segundo corresponde a partículas víricas no infecciosas sin ácido nucleico en su interior (Caul y Appleton, 1982; Willcocks y col., 1990; y Matsui y col., 1993).

Un punto importante a considerar en la purificación de astrovirus mediante gradientes de CsCl es el papel de la presencia de iones divalentes (principalmente Ca^{2+}) con respecto a la estabilidad de las partículas víricas. Mientras que para otros virus la presencia iones divalentes (Ca^{2+} y/o Mg^{2+}) claramente aumenta su estabilidad, en el caso de astrovirus aún no está clara su influencia en la morfogénesis del virus. Mientras que hay autores que sugieren que estos iones son necesarios para el proceso de ensamblaje del virus (Matsui y Greenberg, 2001a), hay otros trabajos que muestran que determinadas concentraciones de iones Ca^{2+} desestabilizan las cápsides y proponen la adición de agentes quelantes, como EDTA, para mantener la integridad del virus durante el proceso de purificación (Castón y col., 1999).

Aunque la mayoría de estudios utilizan los gradientes de CsCl para la purificación de astrovirus, también se han utilizado otros tipos de gradientes con este fin. De este modo, Ashley y Caul (1982) utilizaron gradientes de tartrato potásico argumentando que preservaban mejor la integridad de los virus. En este medio, los astrovirus bandean a una densidad de 1.32 g/ml.

1.3. ASPECTOS CLÍNICOS DE LAS INFECCIONES POR ASTROVIRUS

1.3.1. Transmisión, Patogénesis y Sintomatología

Los astrovirus son transmitidos típicamente por la vía fecal-oral a través de la ingestión de alimentos contaminados o por contacto con fomites previamente contaminados con el virus.

Estudios con voluntarios han demostrado que la ingestión de preparados a partir de extractos de heces de individuos con gastroenteritis causadas por astrovirus puede provocar la aparición de la sintomatología de la enfermedad y la presencia de partículas víricas en las heces de los voluntarios afectados (Kurtz y col., 1979; y Midthun y col., 1993).

A diferencia de lo que sucede con calicivirus, las infecciones por astrovirus en adultos suelen presentar una sintomatología muy leve o incluso ser asintomática. Este hecho puede hacer que los propios adultos actúen de forma inconsciente como vectores de transmisión del virus hacia los niños, los cuales son más susceptibles a la infección, pudiéndose provocar brotes epidémicos con sintomatología variable que ocasionalmente puede llegar a ser grave.

La patogénesis de las infecciones causadas por astrovirus en humanos es un tema que no se conoce bien, y casi todos los datos de que se dispone son extrapolados de estudios realizados en animales. De este modo, se ha demostrado que en ovinos, el virus infecta los enterocitos maduros por la zona apical de los microvillis conduciendo a una atrofia del tapete de microvillis y a una hipertrofia de las criptas. Los ovinos infectados experimentalmente desarrollaban la sintomatología a los 2-4 días de la ingestión del virus y excretaban

partículas víricas entre los días 2 y 9 (Snodgrass y Gray, 1977; y Snodgrass y col., 1979). Durante el periodo de la infección, a nivel celular se observaron inclusiones intracitoplasmáticas, vacuolas en el citoplasma y degeneración del núcleo; características típicas de un proceso de apoptosis o muerte celular programada.

Estudios *in vitro* han mostrado la existencia de una vía endocítica para la internalización de los virus en el interior celular (Donnelly y col., 1992). Recientemente, Guix y col. (2004a) han demostrado que la infección de la línea celular CaCo-2 con astrovirus humanos provoca apoptosis a partir de las 24 horas post-infección existiendo una correlación directa entre la proporción de células apoptóticas en el cultivo y la multiplicidad de infección del virus utilizada.

Por regla general, la gastroenteritis aguda causada por astrovirus se caracteriza por un cuadro de diarrea líquida de una duración de 2-3 días precedida o acompañada por vómitos, fiebre, anorexia y/o dolor abdominal. Esta sintomatología no es distinguible de otras causadas por la infección de otros virus como rotavirus o calicivirus, pero acostumbra a tener un carácter más leve y no suele dar problemas graves de deshidratación.

1.3.2. Epidemiología

Las infecciones causadas por astrovirus ocurren en todos los lugares del mundo (Glass y col., 1996), y principalmente afectan a la población infantil, pero también se han descrito casos en adultos (Gray y col., 1987; Lewis y col., 1989; Oishi y col., 1994; Belliot y col., 1997b; y Pager y Steele, 2003).

A pesar de tratarse de cuadros sintomáticos leves, cabe tener en cuenta a los astrovirus dentro del marco de la salud pública ya que han sido causantes en numerosas ocasiones de brotes de gastroenteritis en escuelas, guarderías, geriátricos, y hospitales. De igual modo, se ha de tener una consideración especial en aquellos pacientes que estando inmunosuprimidos adquieren una infección por astrovirus, ya que se han documentado casos en los que la sintomatología incrementa su severidad con respecto a pacientes no inmunosuprimidos (Wood y col., 1988; Björkholm y col., 1995; Cubbit y col., 1999; Coppo y col., 2000; y Cunliffe y col., 2002).

La incidencia de gastroenteritis causadas por astrovirus oscila entre el 2.5% y el 10% en los países desarrollados (Gaggero y col., 1998; Bon y col., 1999; Foley y col., 2000; y Guix y

col., 2002), mientras que puede llegar a ascender hasta el 26% en países en vías de desarrollo (Maldonado y col., 1998).

La prevalencia de infecciones por astrovirus varía en función de los grupos de edad, pero en general es mayor en niños menores de dos años (Guix y col., 2002). Estudios de seroprevalencia han puesto de manifiesto que la mayoría de los niños adquieren anticuerpos frente a astrovirus durante los primeros años de vida (Kriston y col., 1996; y Koopmans y col., 1998).

El serotipo 1 de astrovirus (HAstV-1) es considerado el más prevalente en todo el mundo (Shastri y col., 1998; Medina y col., 2000; Mustafa y col., 2000; Traore y col., 2000; Guix y col., 2002; y Kang y col., 2002), mientras que los serotipos HAstV-6 y HAstV-7 son los menos frecuentes (Lee y Kurtz, 1994; y Naficy y col., 2000).

Se han descrito varios casos de coinfección de astrovirus con otros patógenos tanto fúngicos como bacterianos y víricos (Shastri y col., 1998; Guix y col., 2002; y Román y col., 2003), e incluso casos de coinfección entre diferentes serotipos de astrovirus (Matsui y col., 1998; y Pang y Vesikari, 1999).

Al igual que sucede con otros virus entéricos como rotavirus y calicivirus, las infecciones por astrovirus son más frecuentes en los meses fríos y/o lluviosos del año, y se ha propuesto un patrón de incidencia bianual (Lee y Kurtz, 1994; Mustafa y col., 2000; y Guix y col., 2002). También se han descrito casos en los que no se da esta estacionalidad, sobre todo en países con clima más uniforme a lo largo de todo el año como México y Egipto (Guerrero y col., 1998; y Naficy y col., 2000).

1.3.3. Inmunidad

Las infecciones por astrovirus que presentan sintomatología se producen principalmente en dos grupos de personas: niños e individuos de avanzada edad. Debido a esta distribución, se cree que la inmunidad frente a astrovirus se adquiere en las primeras etapas de la vida, permanece inalterada durante la madurez, y finalmente empieza a debilitarse en el final de la vida de la persona. Concretamente, un estudio realizado por Mitchell y col. (1999) puso de manifiesto que el 96% de niños con una edad menor de 9 años poseían anticuerpos contra el serotipo HAstV-1.

Aún no se ha adoptado una postura firme sobre la existencia de inmunidad cruzada frente los diferentes serotipos, la mayoría de los datos epidemiológicos inclinan la balanza hacia la existencia de una inmunidad homotípica pero no heterotípica (Mitchell y col., 1999; Naficy y col., 2000; y Guix y col., 2002). Esta hipótesis se ve reforzada por el hecho que la mayoría de brotes en adultos se corresponden con los serotipos menos frecuentes encontrados en estudios epidemiológicos realizados sobre la población infantil (Midthum y col., 1993; Oishi y col., 1994; y Belliot y col., 1997b).

La mucosa intestinal juega un papel crucial en la adquisición de inmunidad frente a repetidas infecciones por astrovirus. Los linfocitos T de la lámina propia intestinal reconocen de forma específica los antígenos de superficie de los astrovirus y al activarse, producen citoquinas, interferón gamma y factor de necrosis tumoral desencadenando toda una respuesta inmune (Molberg y col., 1998).

1.3.4. Tratamiento y Control de la Enfermedad

Las gastroenteritis causadas por astrovirus son generalmente suaves, autolimitantes y no suelen requerir tratamientos específicos. En casos de principio de deshidratación del paciente se puede aplicar una terapia de rehidratación vía oral o intravenosa. En casos más extremos, como pacientes inmunosuprimidos, se ha llegado a administrar inmunoglobulina intravenosa como medida de prevención sin estar muy clara su eficacia específica frente a la infección por astrovirus (Björkholm y col., 1995; y Yuen y col, 1998).

La manera más fácil de evitar una infección por astrovirus es prevenir su transmisión, o sea, obstaculizar las rutas de transmisión del virus hacia las personas. Esto es especialmente importante donde el contacto entre personas es continuo e indiscriminado como en guarderías, escuelas, hospitales y centros asistenciales. Por lo tanto, la primera medida a implementar es establecer unas exigencias mínimas de higiene.

Al tratarse de virus de transmisión fecal-oral, es importante tener conciencia de que los alimentos pueden llegar a ser una fuente importante de contaminación vírica. Por ello, es importante que los alimentos sean manipulados de forma adecuada y que el agua destinada al consumo humano esté debidamente depurada.

Especial mención merece los *fomites* o superficies potencialmente transmisoras de contaminación (Abad y col., 2001). Estas superficies deberían someterse a periódica

desinfección, y se ha demostrado que para ello el metanol al 70% es más efectivo que concentraciones similares de etanol o superiores de metanol (Kurtz y col., 1980).

Finalmente, en lo que hace referencia a una futura vacuna, es pronto para el desarrollo de ésta ya que aún se necesita un mayor conocimiento de los fundamentos de la biología de astrovirus. Cuando éstos estén firmemente establecidos, no cabe duda que los intentos de obtener una vacuna frente astrovirus irán encaminados a que sea efectiva sobre la mayoría de serotipos existentes y que sea capaz de inducir inmunidad en niños de corta edad (Naficy y col., 2000).

1.4. TÉCNICAS DE DETECCIÓN Y DIAGNÓSTICO DE ASTROVIRUS

1.4.1. Microscopía Electrónica

La microscopía electrónica ha sido, es y será una técnica básica para la detección de cualquier tipo de virus causante de gastroenteritis. En el caso de astrovirus, permitió su descubrimiento en 1975 y ha sido la técnica más utilizada para su diagnóstico hasta la aparición de las técnicas moleculares.

No obstante, presenta dos limitaciones importantes: su límite de sensibilidad estimado en aproximadamente 10^6 - 10^7 virus por gramo de heces (Madeley y Cosgrove, 1975) y la dificultad de diferenciar entre astrovirus y otros virus con una morfología similar, como pueden ser los *Norovirus* o los *Sapovirus*, incluso para un microscopista especializado. Sólo un 10% de los astrovirus presentes en las heces de un paciente infectado presentan la característica morfología en forma de estrella (Oliver y Phillips, 1988).

1.4.2. Ensayos Inmunológicos

1.4.2.1. Inmunoelectromicroscopía

La sensibilidad y especificidad de la microscopía electrónica se incrementó con la aparición de anticuerpos específicos frente a astrovirus. De este modo, se pusieron a punto técnicas de inmunoelectromicroscopía en fase sólida (SPIEM) en las que las rejillas de microscopía electrónica eran recubiertas con el anticuerpo específico frente al virus (Konno y col., 1982; Oliver y Phillips, 1988; y Oishi y col., 1994). Estas técnicas también permitieron realizar el serotipado de astrovirus a partir de la utilización de los anticuerpos policlonales de conejo de referencia (Kurtz y Lee, 1984; Moe y col., 1991; Kjeldsberg, 1994; y Taylor y col., 2001b).

1.4.2.2. Ensayos inmunoenzimáticos

Herrmann y col. diseñaron los primeros ensayos inmunoenzimáticos (E.L.I.S.A.) para la detección específica de astrovirus. Los ensayos se basaban en recubrir la placa de E.L.I.S.A. con el anticuerpo monoclonal 8E7 el cual reconoce un epítipo común a todos los serotipos. Posteriormente, la placa era incubada con la muestra fecal y los astrovirus capturados por el anticuerpo monoclonal eran detectados con un anticuerpo policlonal de conejo específico frente astrovirus (Herrmann y col., 1990).

Con diferencia, éste ensayo inmunoenzimático ha sido el más utilizado en estudios epidemiológicos (Herrmann y col., 1991; Lew y col., 1991; Cruz y col., 1992; y Shastri y col., 1998).

Hoy en día existe en Europa un *kit* comercial de diagnóstico de astrovirus distribuido por la compañía DAKO Diagnostics (United Kingdom), “*IDEIATM Astrovirus EIA*”, equivalente al ensayo inmunoenzimático puesto a punto por Herrmann y col.

En general, los ensayos inmunoenzimáticos presentan una sensibilidad ligeramente superior a las técnicas microscópicas, con un límite de sensibilidad de 10^5 - 10^6 virus por gramo de heces, y una especificidad que puede alcanzar el 98%.

1.4.2.3. Ensayos de aglutinación

Estos ensayos basados en la utilización de anticuerpos policlonales y bolas de látex han sido poco utilizados debido a que su sensibilidad no supera la de los ensayos inmunoenzimáticos y tienen dificultades para detectar más de un serotipo de astrovirus. Por contrapartida presentan las ventajas de ser métodos fáciles y rápidos de realizar (Kohno y col., 2000; y Komoriya y col., 2003).

1.4.3. Inmunofluorescencia

La detección de diferentes antígenos de astrovirus por inmunofluorescencia es una técnica útil para la detección de virus infecciosos, su serotipado, su cuantificación y la localización subcelular de las diferentes proteínas víricas de astrovirus adaptados a replicar *in vitro* en cultivos celulares (Taylor y col., 1997; Guix y col.; 2004b). Esta técnica se basa en la utilización de anticuerpos secundarios marcados con fluorocromos para detectar el complejo antígeno-anticuerpo primario en cultivos infectados.

1.4.4. Métodos moleculares

1.4.4.1. Hibridación específica de ácidos nucleicos

Estas técnicas se basan en la utilización de sondas de ADNc o ARN marcadas con isótopos radioactivos, o bien con biotina o con digoxigenina, que son complementarias al genoma de astrovirus.

La hibridación fue una de las primeras técnicas moleculares utilizadas en la detección de astrovirus. Su sensibilidad no mejoraba las prestaciones que se alcanzaban con la microscopía electrónica o técnicas inmunológicas, pero permitía identificar de forma inequívoca la presencia de genomas de astrovirus en aquellas muestras en las que la morfología y/o la antigenicidad del virus no estaban bien conservadas y por lo tanto podían dar lugar a falsos negativos por las técnicas anteriormente mencionadas (Moe y col., 1991; y Willcocks y col., 1991).

Posteriormente, Belliot y col., (2001) pusieron a punto una técnica de hibridación en estado líquido que presentaba una elevada especificidad de forma que era capaz de detectar genomas de astrovirus y realizar una primera clasificación según el genogrupo de astrovirus.

1.4.4.2. RT-PCR: *Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction*.

La implantación de la RT-PCR como técnica básica en laboratorios de investigación y diagnóstico para cualquier tipo de muestra, ya sea de origen fecal o ambiental, ha abierto las puertas a la realización de estudios tanto epidemiológicos como filogenéticos en base al análisis de las secuencias de los genomas de los virus detectados.

Las principales ventajas de la RT-PCR frente al resto de técnicas de detección son su elevada sensibilidad, elevada especificidad, la no limitación de reactivos como era el caso de los inmunoensayos y los anticuerpos específicos frente al virus, y la posibilidad de implementar sistemas de genotipado. Por otro lado, y al igual que pasa con la mayoría de las técnicas de diagnóstico basadas en la detección de proteínas o del genoma, presenta el inconveniente de que es incapaz de diferenciar entre partículas infecciosas y no infecciosas, discriminación muy importante en epidemiología ambiental.

A nivel de las diferentes RT-PCR diseñadas para la detección de astrovirus se puede hablar de dos tipos: RT-PCR genéricas (detectan todos los serotipos) y RT-PCR específicas de

serotipo. En cualquier caso, el tamaño del amplímero obtenido no acostumbra a superar las 700 pb, y por norma general se estima que la sensibilidad de las distintas RT-PCR oscila entre los 10 y 100 virus por reacción.

1.4.4.2.1. RT-PCR genéricas

Las diferentes RT-PCR genéricas que se han diseñado no se centran en la amplificación de una zona concreta del genoma de astrovirus, sino que amplifican zonas muy distantes dentro del genoma. Entre las más comúnmente utilizadas destacan, agrupadas por la zona del genoma que amplifican, las siguientes:

Ø **ORF1a**: La RT-PCR basada en los cebadores Mon340 y Mon348 amplifica una región del genoma del virus donde se encuentra el dominio catalítico de la putativa proteasa del virus la cual está muy conservada entre los diferentes serotipos (Belliot y col., 1997a). Esta RT-PCR ha sido utilizada en varios estudios epidemiológicos (Traore y col., 2000; y Cunliffe y col., 2002).

Cabe destacar también la RT-PCR basada en los cebadores A1 y A2 que amplifica una región del extremo 3' del ORF1a y que ha sido utilizada en la descripción de deleciones en el genoma (Willcocks y col., 1994a) así como en estudios epidemiológicos (Guix y col., 2002) y en la puesta a punto de un método de genotipado (Guix y col., *manuscrito en preparación*).

Ø **ORF1b**: En esta zona destaca la RT-PCR basada en los cebadores Mon343 y Mon344 la cual amplifica una región del genoma correspondiente a la ARN polimerasa (Belliot y col., 1997c). Sin embargo, esta RT-PCR no ha sido utilizada de forma asidua en estudios epidemiológicos.

Ø **ORF1b-ORF2**: La amplificación de esta región del genoma con los cebadores Mon270 y Mon344 permitió identificar la primera cepa recombinante salvaje de astrovirus humanos (Walter y col., 2001).

Ø **5'-ORF2**: Sin lugar a dudas, las RT-PCR basadas en la amplificación de esta zona del genoma han sido las más utilizadas para la realización de estudios epidemiológicos. Entre todos los pares de cebadores destacan la pareja Mon244/Mon245 descritos por Noel y col. (1995). La buena correlación entre la secuencia del amplímero y el serotipo del virus ha hecho que esta RT-PCR haya sido utilizada en un gran número de estudios epidemiológicos como base para

realizar un serotipado molecular de las muestras (Palombo y Bishop, 1996; Gaggero y col., 1998; y Guix y col., 2002). Hoy en día se dispone en el *GenBank* de una gran cantidad de secuencias nucleotídicas de esta región.

- Ø **3'-ORF2**: Esta zona es la región más variable del genoma de astrovirus por lo que el diseño de RT-PCR genéricas para la detección de astrovirus ha sido muy limitado. Hasta el momento sólo se han descrito un par de RT-PCR que tienen el inconveniente de no poder detectar los diferentes serotipos de astrovirus en su totalidad (Saito y col., 1995; y Sakon y col., 2000).

- Ø **3'-UTR**: Las diferentes RT-PCR que amplifican la región 3' no traducida del genoma de astrovirus presentan una elevada sensibilidad debido al pequeño tamaño del amplímero obtenido (Jonassen y col., 1993; y Mitchell y col., 1995). Por esta razón, éstas son las RT-PCR más utilizadas en la detección de astrovirus en muestras de origen ambiental (Marx y col., 1998; y Taylor y col., 2001a) y muestras de marisco (Le Guyader y col., 2000).

1.4.4.2.2. RT-PCR específicas de serotipo

A diferencia de las RT-PCR genéricas, las RT-PCR específicas de serotipo se centran en amplificar zonas muy concretas de la región 3' del ORF2. La gran variabilidad de esta región permite genotipar y serotipar los virus en función del tamaño del amplímero obtenido sin necesidad de realizar secuenciación de ácidos nucleicos.

De este modo, Matsui y col. (1998) diseñaron una RT-PCR que se basaba en la utilización de un cebador común a todos los serotipos y una mezcla de cebadores específicos de serotipo de manera que se podía distinguir los diferentes serotipos de astrovirus en función del tamaño del amplímero obtenido.

Un diseño similar fue llevado a cabo por Mitchell y col. (1999) introduciendo una serie de modificaciones a su RT-PCR del 3'-UTR (Mitchell y col., 1995).

1.4.4.3. RT-PCR a tiempo real (*Real Time* RT-PCR)

Una de las limitaciones de la RT-PCR es que se trata de una técnica cualitativa, presencia o ausencia de virus, y por lo tanto no permite la cuantificación de la carga viral de la muestra.

Hoy en día esta limitación está siendo superada gracias a la aparición de la RT-PCR a tiempo real que permite determinar la cantidad de genomas víricos en una muestra. Esta técnica novedosa fue diseñada inicialmente para realizar un seguimiento a nivel clínico de las viremias en pacientes con enfermedades como hepatitis C o SIDA y que estaban siendo sometidos a algún tipo de tratamiento antiviral. Esta técnica una sensibilidad equiparable a la RT-PCR convencional, pero permite la cuantificación de virus en casos como los descritos anteriormente, donde nos encontramos con cargas víricas importantes. También presenta la ventaja de ser un proceso más fácilmente estandarizable y automatizable que la RT-PCR convencional.

Con respecto a la detección y cuantificación de astrovirus ya ha aparecido un estudio que utiliza la RT-PCR a tiempo real para la cuantificación de virus en aguas residuales (Le Cann y col., 2004).

1.4.4.4. Métodos moleculares combinados

1.4.4.4.1. Infección en cultivo y RT-PCR: *CC - RT-PCR*

Esta técnica combinada está pensada para eliminar inhibidores de la reacción de RT-PCR e incrementar su sensibilidad en aquellas muestras en las que la carga vírica es muy baja. Al realizar un pasaje de las muestras por cultivo celular, se consigue que los virus infecciosos presentes en bajo número repliquen y aumenten su número de manera que cuando el producto de la infección sea analizado por RT-PCR dé un resultado positivo.

Este tipo de técnica combinada ha sido utilizada principalmente en estudios ambientales (Abad y col., 1997; Mustafa y col., 1998; y Chapron y col., 2000).

1.4.4.4.2. Infección en cultivo celular y microscopía de fluorescencia

Si bien no se trata de una técnica con una parte estrictamente molecular, Matsui y col. (2001b) pusieron a punto un método de detección de astrovirus infecciosos basado en una línea celular *reporter* obtenida por biotecnología. Este método se basa en la línea celular CaCo-2 transformada de forma estable con una construcción que contiene bajo el promotor del virus de sarcoma de Rous el ADNc de astrovirus con dos modificaciones: una mutación que anula la función ARN polimerasa del virus; y la sustitución de las proteínas estructurales del virus por el gen de la *green*

fluorescent protein (GFP). De este modo, la presencia de astrovirus infecciosos en la muestra a analizar permite que en las células infectadas se complemente la actividad ARN polimerasa y se sintetice el teórico ARN subgenómico que daría lugar a la síntesis de las proteínas de la cápside del virus, pero que al haber sido substituidas por el gen de la proteína GFP, se expresa ésta última la cual es fácilmente detectable con un microscopio de fluorescencia.

1.4.4.4.3. RT-PCR y polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción: *RT-PCR* - *RFLP*

Esta técnica permite distinguir entre los diferentes genotipos de astrovirus sin necesidad de realizar técnicas inmunológicas ni de secuenciación de ácidos nucleicos (Guix y col., *manuscrito en preparación*). Una región del extremo carboxi-terminal del ORF1a del genoma es amplificada por RT-PCR con los cebadores A1 y A2, y el amplímero, que presentaba un tamaño variable en función del serotipo y/o genotipo (entre 189 pb y 237 pb), es digerido con la enzima de restricción Dde I. Cada genotipo tiene asociado unos patrones de digestión concretos (patrón RFLP) de forma que en función de dicho patrón se puede asociar el aislado con un genotipo u otro.

1.4.5. Secuenciación de ácidos nucleicos

Los primeros estudios de variabilidad genética en astrovirus confirmaron la existencia de una buena correlación entre el serotipo y el genogrupo o subgenogrupo deducido a partir de la secuencia de una región del extremo amino-terminal del ORF2 (Noel y col., 1995).

Más adelante se demostró que las agrupaciones filogenéticas variaban en función de la zona del genoma analizada. Se observó que los análisis basados en el ORF1b o ORF2 daban lugar a agrupaciones filogenéticas equidistantes que correlacionaban perfectamente con los serotipos, mientras que al analizar el ORF1a, los virus se agrupaban claramente en dos agrupaciones diferentes denominados genogrupo A (incluye los serotipos del 1 al 5 y el 8) y genogrupo B (incluye los serotipos 6 y 7) (Belliot y col., 1997c).

Estas diferencias en la distribución de las agrupaciones filogenéticas en función de las zonas analizadas sugieren la existencia de diferentes presiones selectivas sobre distintos puntos del genoma así como la posibilidad de la existencia de fenómenos de recombinación entre diferentes virus a lo largo de su historia evolutiva (Lukashov y Goudsmit, 2002).

1.5. BACULOVIRUS: VECTORES DE EXPRESIÓN GÉNICA HETERÓLOGA

1.5.1. Baculovirus: Perspectiva Histórica

Los diferentes baculovirus forman parte de uno de los grupos más importantes de virus que tienen como hospedadores naturales diferentes especies de insectos.

A pesar de que son virus que no afectan directamente al género humano, su existencia siempre ha sido fuente de preocupación para el hombre debido a su asociación con enfermedades en insectos de interés económico como el gusano de seda y la abeja.

A medida que aumentaba el conocimiento biológico de estos virus, el hombre empezó a mostrar interés gracias a su utilidad como pesticida biológico alternativo a los pesticidas químicos, y más adelante como herramienta en biología molecular.

A principios del siglo XIX se asoció una enfermedad del gusano de seda con unos cuerpos cristalinos de forma poliédrica llamados por aquel entonces poliedro (de la palabra *polyhedra* en latín). Pero no fue hasta 1947 cuando Gernot Bergold describió que este poliedro estaba formado por una matriz proteica que en su interior contenía unos viriones en forma de bastón (morfología característica de los baculovirus). Precisamente, en referencia a su morfología, el nombre de baculovirus deriva de la palabra *baculum*, que significa bastón en latín.

Varios estudios de las décadas de los años 40 y 50 ya apostaron por la utilización de los baculovirus como pesticidas biológicos (Steinhaus, 1947). Actualmente en Brasil, más de

un millón de hectáreas son tratadas con un baculovirus para controlar las posibles plagas de la mariposa de la soja; y en Europa un tratamiento similar es utilizado para controlar la polilla de la manzana (Moscardi, 1999).

Un importante paso en el estudio de estos virus llegó a partir de los años 60 con el establecimiento de cultivos celulares que permitían su replicación *in vitro* (Grace, 1962; y Hink, 1970) y de ensayos de cuantificación por calvas (Hink y Vail, 1973).

Finalmente, a partir de los años 70, el estudio de los baculovirus se ha centrado principalmente en tres vías de investigación:

- su utilización como vectores de expresión heteróloga,
- generación de biopesticidas modificados genéticamente,
- modelo de replicación, ensamblaje e interacción con la célula huésped.

1.5.2. Características Biológicas

1.5.2.1. Morfología y Estructura

Los baculovirus se caracterizan por presentar dos formas de partículas infecciosas morfológicamente diferentes: viriones individualizados con envuelta lipídica, y viriones embebidos en una matriz cristalina proteica, "poliedro". Ambas formas se producen de forma secuencial en el ciclo de multiplicación bifásico del virus (Williams y col., 1997).

En ambos casos, el virión presenta una cápside en forma de bastón con un tamaño de 250-300 nm de largo por 30-60 nm de diámetro (Funk y col., 1997). Se ha sugerido que la existencia de un extremo diferencial en la estructura de la cápside puede estar relacionado con alguna función biológica en el ciclo replicativo del virus (Fraser, 1986; y Vialard y Richardson, 1993). La cápside está formada mayoritariamente por una proteína de 35-40 kDa (Summers y Smith, 1978; Pearson y col., 1988; y Thiem y Miller, 1989).

En el interior de la cápside está el genoma del virus constituido por un ácido nucleico de ADN bicatenario circular de un tamaño entre 90 y 160 kpb.

En los viriones individualizados, la cápside está rodeada por una membrana lipídica adquirida en la liberación del virus al exterior celular por evaginación de la membrana plasmática de la célula huésped. Esta morfología es la responsable de la infección célula a célula tanto *in vivo* dentro del insecto como *in vitro* en cultivo celular.

Por otro lado, los viriones contenidos en el poliedro están rodeados de una matriz cristalina formada por una proteína mayoritaria de 29 kDa llamada poliedrina. Esta forma embebida del virus, que puede alcanzar las 15 micras de diámetro, es la que permite la transmisión del virus entre diferentes individuos debido a su elevada resistencia en el medio ambiente.

1.5.2.2. Taxonomía y Clasificación

Los virus que infectan insectos se clasifican en diferentes familias en función del tipo de ácido nucleico que presentan y de la presencia o ausencia de envuelta lipídica alrededor de la cápside.

Los baculovirus presentan un genoma de ADN bicatenario circular y envuelta lipídica, y se incluyen dentro de la familia *Baculoviridae*. Esta familia se divide al mismo tiempo en dos géneros: *Granulovirus* y *Nucleopolyhedrovirus*. La diferencia entre ambos está en la cantidad de viriones que forman parte de cada poliedro. En el caso de los *Granulovirus*, el número de viriones siempre es uno, mientras en el caso de los *Nucleopolyhedrovirus* este número puede superar fácilmente los 20 viriones.

Dentro de cada género hay un miembro representativo. El *Autographa californica* nucleopoliedrovirus (AcNPV) es el miembro tipo de los *Nucleopolyhedrovirus*, mientras en el caso de los *Granulovirus*, este nombramiento corresponde al *Cydia pomonella* granulovirus (CpGV).

Entre todos los baculovirus, el mejor estudiado es el AcNPV.

1.5.2.3. Replicación, Transcripción y Traducción del Genoma

El ciclo replicativo de los baculovirus presenta dos fases: una primera fase en la que el poliedro infecta las células intestinales de las larvas, y una segunda en la que los virus originados en la primera fase llevan a cabo la subsiguiente infección de los tejidos secundarios.

Una vez el virión ha entrado en una célula, las nucleocápsides, formadas por la cápside y el genoma, se dirigen hacia el interior del núcleo donde tiene lugar el desensamblaje de la cápside y la liberación del genoma. Todos estos pasos tienen lugar de forma rápida, ya que se ha demostrado *in vitro* que a los 15 minutos de la infección ya se detecta ARN viral de nueva síntesis.

En el genoma de los baculovirus existen más de 300 ORF que presentan una expresión diferencial en el tiempo. En base a la expresión diferencial de los genes, el ciclo replicativo de los baculovirus se divide en tres fases secuenciales en el tiempo:

- Ø Fase temprana: La fase temprana de la replicación se alarga desde las 0 a las 6-9 horas tras la infección. Esta fase se caracteriza por la expresión de genes activadores de la transcripción, de la ARN polimerasa vírica, de factores de replicación del ADN, de supresores de apoptosis y otros. Los productos de estos genes preparan la célula para la inminente síntesis de gran cantidad de componentes de origen vírico que pueden llegar a representar un tercio de la masa celular total. También se produce un bloqueo del ciclo celular acumulando las células en fase S (fase de síntesis).
- Ø Fase tardía: Esta fase se alarga desde las 6 a las 18 horas tras la infección. En ella, tiene lugar la replicación del genoma vírico así como la expresión de los genes estructurales necesarios para la producción de nuevos viriones.
- Ø Fase muy tardía: Esta fase, que dura desde las 18 horas hasta la muerte de la célula huésped, se caracteriza por la sobreexpresión de genes que dan lugar a la formación de la matriz cristalina que embeberá a los viriones acabando en la producción de la forma poliédrica del virus. Entre estos genes destaca el gen *polh* que codifica para la proteína mayoritaria de la matriz cristalina, la poliedrina, y el gen *p10*. Los promotores de transcripción de estos genes presentan unos motivos TAAG que hacen que se expresen a muy elevados niveles dando lugar a grandes cantidades de proteína al final del ciclo replicativo del virus.

1.5.3. Los Baculovirus como Vectores de Expresión Génica Heteróloga

En el campo de la biotecnología, los baculovirus son conocidos por su alta eficiencia como vectores de expresión génica heteróloga en células eucariotas (O'Reilly y col., 1992; Jarvis, 1997; y Kost y Condreay, 1999).

Los vectores de expresión de baculovirus se caracterizan por su capacidad de producir inmensas cantidades de proteínas heterólogas funcionales. Además, dichas proteínas, al encontrarse bajo un entorno celular eucariota, adquieren muchas de las modificaciones post-traduccionales y plegamientos que tendrían en su entorno natural.

El sistema de expresión de baculovirus ha sido utilizado en cientos de estudios dentro del campo de la virología con aplicaciones directas sobre el conocimiento de la estructura y

funcionalidad de las proteínas expresadas, producción de partículas *virus-like* y desarrollo de vacunas recombinantes.

La utilización de los baculovirus como sistema de expresión se basa en la sustitución de los genes de la fase muy tardía, principalmente *polh* y *p10*, por los genes de interés. Estos genes de expresión muy tardía se caracterizan por tener elevadísimos niveles de expresión y por ser prescindibles en el ciclo replicativo del baculovirus. De este modo, no se pone en peligro la replicación del virus y se obtienen enormes cantidades de la proteína de interés en el medio de cultivo.

En los inicios de la utilización de este sistema de expresión, la construcción de los vectores de expresión era lenta y difícil. Hoy en día, con los avances de la biología molecular y biotecnología, existen *kits* comerciales que aseguran la obtención de los vectores de expresión en un periodo de tiempo corto y con una eficiencia próxima al 100%. Además, estos kits comerciales presentan un amplio abanico de posibilidades en lo que hace referencia a la expresión génica múltiple y obtención de proteínas de fusión.

2. OBJETIVOS

Objetivos

Los objetivos marcados al comienzo del trabajo presentado en esta memoria se agruparon en dos bloques: replicación y morfogénesis de astrovirus.

En cuanto a la replicación, los objetivos fueron:

- Puesta a punto de una técnica molecular rápida, sencilla y fiable para la cuantificación de astrovirus (RT-PCR competitiva) y su aplicación en un estudio epidemiológico con el fin de determinar los niveles de carga vírica excretados en las heces de niños con gastroenteritis causadas por astrovirus y de establecer si hay diferencias entre los diferentes serotipos o genotipos del virus.
- En caso de encontrar dichas diferencias entre los diferentes serotipos o genotipos, estudiar el papel de la proteína nsP1a/4 de astrovirus en la replicación del ARN vírico y producción de progenie vírica.

En cuanto a la morfogénesis, los objetivos fueron:

- Obtención de partículas *virus-like* (VLPs) de astrovirus en el sistema de expresión heteróloga de baculovirus recombinantes según dos de los modelos de ensamblaje de la cápside vírica descritos en la bibliografía y su utilización como modelo del virus en estudios morfogénicos.

3. ESTUDIO I:

**CUANTIFICACIÓN DE ASTROVIRUS POR RT-PCR COMPETITIVA.
APLICACIÓN EN UN ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO**

3.1. ANTECEDENTES

Desde que en 1975 Madeley y Cosgrove aplicaran el término de *astrovirus* para describir unas partículas de unos 28 nm de diámetro con apariencia estrellada en las heces de niños hospitalizados con diarrea, la microscopía electrónica ha sido la herramienta más utilizada para el diagnóstico de astrovirus como agente infeccioso causante de gastroenteritis (Kjeldsberg, 1977; Berthiaume y col., 1981; Konno y col., 1982; y Kurtz y Lee, 1987). La inmunoelectromicroscopía era la técnica elegida para confirmar que las partículas víricas encontradas en las heces de los pacientes eran astrovirus.

Aunque su importancia médica fue cuestionada en el pasado, la aparición de técnicas de diagnóstico más sensibles que la microscopía electrónica y los inmunoensayos, como la RT-PCR (Jonassen y col., 1993; Mitchell y col., 1995; Noel y col., 1995; y Belliot y col., 1997a), han situado a los astrovirus entre los más importantes agentes víricos causantes de gastroenteritis en niños.

Hoy en día, existen un sinnúmero de estudios epidemiológicos en todo el mundo que han puesto de manifiesto dicha causalidad (Herrmann y col., 1991; Lew y col., 1991; Moe y col., 1991; Shastri y col., 1998; González y col., 1998; Bon y col., 1999; Traore y col., 2000; Cunliffe y col., 2002; y Guix y col., 2002). La mayoría de los estudios se han realizado sobre la población infantil, pero también se han descrito casos en personas de avanzada edad e inmunosuprimidos (Gray y col., 1987; Cox y col., 1994; y Coppo y col., 2000).

Normalmente, la infección causada por astrovirus produce una sintomatología de baja severidad, incluso con casos asintomáticos (Cruz y col., 1992; y Maldonado y col., 1998).

Los síntomas clásicos de una gastroenteritis causada por astrovirus son una diarrea suave acompañada de vómitos, fiebre y/o dolor abdominal, y que no acostumbra a precisar hospitalización. Los síntomas suelen remitir a los 4 días de su aparición (Greenberg y Matsui, 1992), aunque se han observado casos en los que tanto la sintomatología como la excreción de virus en las heces se han prolongado en el tiempo dando lugar a cuadros clínicos de deshidratación con la consecuente hospitalización del paciente (Naficy y col., 2000). Son muy pocos los casos descritos de gastroenteritis causadas por astrovirus que hayan llevado al fallecimiento del enfermo.

En la mayoría de estudios epidemiológicos, la prevalencia de astrovirus se sitúa alrededor del 2.5 - 10%, por detrás de rotavirus y al mismo nivel que calicivirus. Por serotipos, los más prevalentes son el 1 y el 3, siendo los serotipos 5, 6 y 7 los menos frecuentes (Gaggero y col., 1998; Mustafa y col., 1998; Bon y col., 1999; Foley y col., 2000; y Svenungsson y col., 2000; y Guix y col., 2002). Concretamente en España existen tres estudios epidemiológicos de astrovirus: uno en la ciudad de Zaragoza con una prevalencia del 5.5% (López y col., 2000), otro en Madrid con una prevalencia del 11.4% (Dalton y col., 2002) y otro en la área metropolitana de Barcelona con una prevalencia del 4.9% (Guix y col., 2002). En los dos últimos casos, el serotipo más prevalente fue el HAsTV-1.

Hasta el momento existen muy pocos datos acerca de la patogénesis causada por la infección de astrovirus así como de su estrategia de replicación en el intestino y de los niveles de carga vírica producidos. Del mismo modo, no se ha sugerido ninguna relación entre la carga viral en heces, la severidad de la sintomatología y el serotipo de astrovirus causante de la enfermedad.

Los objetivos de este estudio fueron determinar los niveles de carga vírica en las heces de pacientes provenientes de un estudio epidemiológico realizado sobre la población infantil del área metropolitana de la ciudad de Barcelona, e intentar establecer una relación entre carga vírica, severidad de la sintomatología y serotipo y/o genotipo de astrovirus causante de la enfermedad.

Para conseguir estos objetivos se puso a punto una técnica de RT-PCR competitiva que permitiese determinar la carga de astrovirus en cualquier tipo de muestra. La eficiencia de esta técnica fue contrastada con una suspensión de astrovirus purificados de concentración conocida.

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1. Virus y Líneas Celulares

A lo largo de este estudio se utilizó la línea celular CaCo-2 y la cepa p23795 del astrovirus humano serotipo 4 (HAstV-4) adaptada a cultivo celular. En el apartado 7.1 se detallan las características de la línea celular y el protocolo de subcultivo, así como el origen de la cepa vírica mencionada.

3.2.2. Purificación de Astrovirus en Gradientes de Sacarosa

La primera parte del estudio que se llevó a cabo fue la puesta a punto de un método de obtención de suspensiones de astrovirus purificados mediante gradientes de sacarosa.

Brevemente, la técnica de purificación de virus consistía en ultracentrifugar un mililitro de suspensión de astrovirus concentrada (ver apartado 7.2.1) a través de un gradiente de 9 ml preformado de sacarosa del 0% al 45% (p/p) en tampón TNE (Tris-HCl 50 mM, NaCl 100 mM y EDTA 10 mM). Las condiciones de la ultracentrifugación eran: 2 h 45 min a 205.000 g a 4 °C en el rotor SW-41 (Beckman).

Tras la centrifugación, el gradiente era fraccionado con la ayuda de una bomba peristáltica P-1 (Amersham Pharmacia) en fracciones de aproximadamente 0.3 ml.

Para determinar en qué fracciones del gradiente se encontraba el virus, se realizó un ensayo inmunoenzimático (E.L.I.S.A.) de captura basado en el método previamente descrito por Herrmann y col. (1990). Brevemente, la placa de E.L.I.S.A. era recubierta con el anticuerpo monoclonal (MAb) 8E7, y tras incubarla con las diferentes fracciones del gradiente, los virus eran detectados con un anticuerpo policlonal de conejo anti-HAstV-1 (ver apartado 7.3). Las muestras antigénicamente positivas eran examinadas bajo el microscopio electrónico para observar la presencia y cuantificar el número de partículas víricas (ver apartado 3.2.3). Aquellas fracciones en las que coincidiese la presencia de antígeno y de genoma víricos eran claras candidatas a contener astrovirus infecciosos purificados.

Finalmente, para determinar en qué fracciones antigénicamente positivas estaba presente el genoma del virus, se realizó una extracción de ácidos nucleicos de dichas fracciones según el método de Boom y col. (1990) (ver apartado 7.4). Los genomas del virus se detectaron por *dot blot* e hibridación molecular con una sonda de ADNc de 412 pb marcada con digoxigenina y específica de una región del ORF2 del genoma de astrovirus (ver apartado 7.5).

3.2.3. Determinación del Número de Partículas Víricas

Una vez estandarizado el método de purificación de astrovirus en gradientes de sacarosa, se determinó el número de partículas víricas infecciosas en las diferentes fracciones antigénicas.

Para ello se utilizó el método basado en la combinación de un ensayo de infectividad en cultivo celular y de detección de ácidos nucleicos por RT-PCR (CC-RT-PCR) descrito previamente por Abad y col. (1997). Brevemente, el método se basaba en infectar monocapas de células CaCo-2 con diluciones decimales de cada fracción a titular (ver apartado 7.2.1). El medio y las células eran recogidos a los 4-6 días post-infección, y tras realizar una extracción de ácidos nucleicos (ver apartado 7.4), se evaluaba la presencia de genomas de astrovirus mediante RT-PCR (ver apartado 7.6).

La RT-PCR se realizaba con los cebadores A1 (5'-CCTGCCCCGAGAACAACCAAGC-3') y A2 (5'-GTAAGATTCCCAGATTGGTGC-3'), descritos con anterioridad por Willcocks y col. (1994b). Las enzimas utilizadas fueron la *M-MLV RT* (Promega) y la *Expand High Fidelity PCR System* (Roche). La amplificación del ADNc obtenido mediante retrotranscripción se llevaba a cabo siguiendo el programa de PCR detallado a continuación: una desnaturalización inicial de 3 min a 95 °C; 40 ciclos de amplificación desglosados en una

desnaturalización de 30 sec a 94 °C, una hibridación de 30 sec a 55 °C y una elongación de 30 sec a 72 °C; y una elongación final de 7 min a 72 °C. El amplímero resultante de 192 pb era visualizado tras electroforesis en gel de agarosa al 1.5% (ver apartado 7.7). El título infeccioso de cada fracción se expresó como unidades de RT-PCR en cultivo celular por mililitro (uCC-RT-PCR/ml) teniendo en cuenta la última dilución positiva por RT-PCR.

También se determinó el número de partículas víricas físicas en las diferentes fracciones antigénicas. Con este fin, se realizó un recuento de partículas víricas bajo el microscopio electrónico de transmisión en comparación con el número de partículas de oro coloidal de 42 nm de una suspensión de concentración estimada por densidad.

Brevemente, tras dializar las fracciones durante 24 h frente a tampón TNE, 10 µl de la fracción junto con 1 µl de la suspensión de partículas de oro coloidal de 42 nm de concentración conocida eran colocados sobre una rejilla de cobre carbonatada (400 *mesh*). Tras 15 min de adsorción, la rejilla era teñida durante 1-2 min con PTA al 2% (pH 6.5). Finalmente, las rejillas eran observadas en el microscopio electrónico de transmisión Hitachi HT600 AB. Entonces, se enumeraba las partículas víricas y las partículas de oro coloidal presentes en diferentes campos. La concentración de virus en la suspensión era estimada en relación al número de partículas de oro coloidal contadas, ya que la concentración de éstas últimas era conocida.

3.2.4. Construcción de un Control Interno de ARN

Para la puesta a punto de la RT-PCR competitiva lo primero que se requiere es la construcción de un control interno de ARN que pueda competir con los genomas víricos en la reacción de RT-PCR. La Figura 3.1 muestra un esquema de los principales pasos en la construcción del control interno de ARN para la RT-PCR con los cebadores A1 y A2.

Para la construcción del control interno de ARN se partió del amplímero de 192 pb obtenido por RT-PCR a partir del genoma del HAsV-4, cepa p23795. La RT-PCR se realizó de la misma forma que en el apartado 3.2.3, pero en este caso las enzimas utilizadas fueron la *M-MLV RT* (Promega) y la *Pwo DNA Polymerase* (Roche) con el fin obtener un amplímero con extremos romos (Paso 1, Figura 3.1).

El amplímero de 192 pb, que contenía dos dianas de restricción Dde I separadas por 57 pb, fue digerido con dicha enzima durante 12 h a 37 °C, obteniéndose tres moléculas de ADN de 71, 57 y 64 pb desde el extremo 5' al 3' del amplímero original (Paso 2, Figura 3.1).

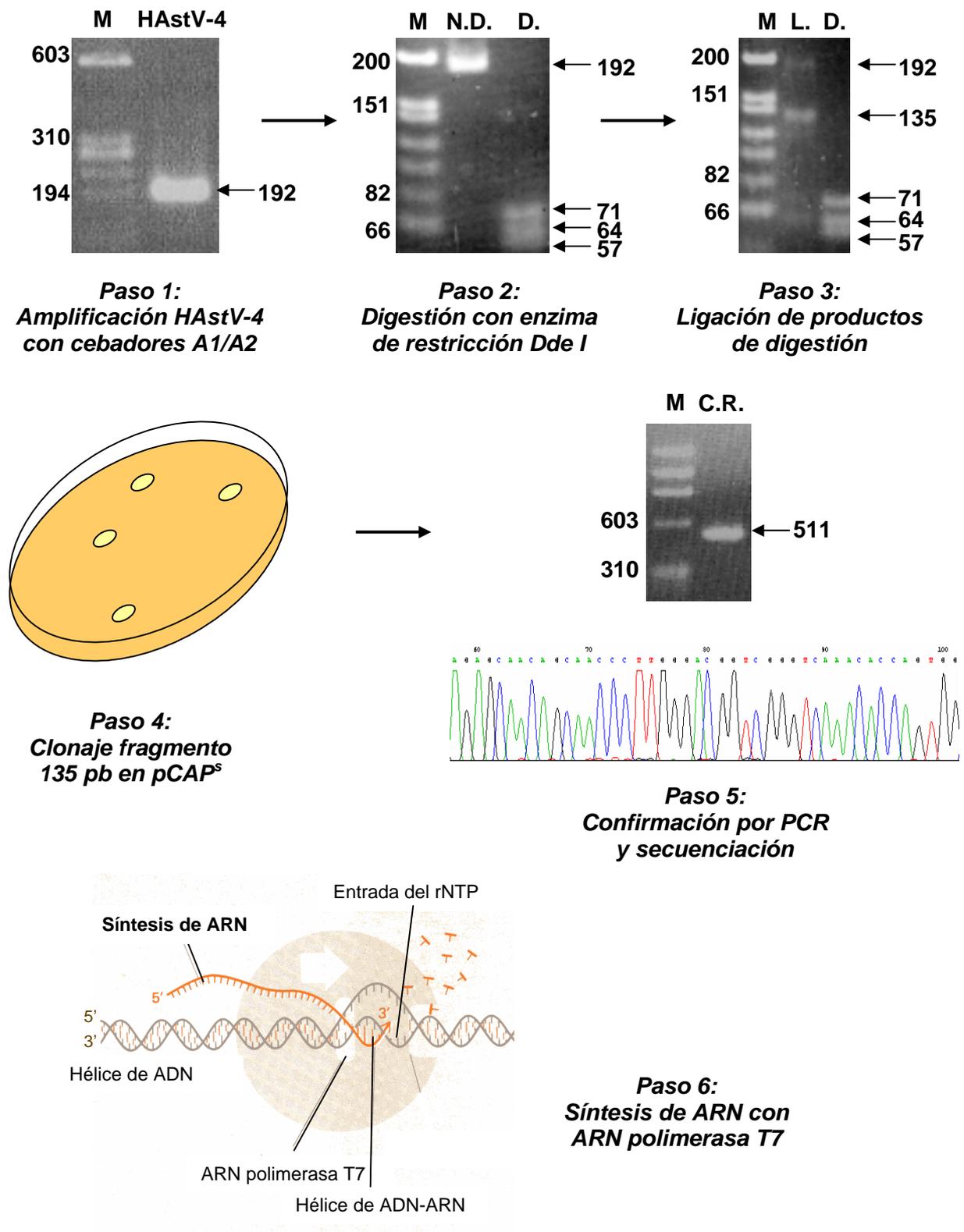


Figura 3.1: Esquema de la construcción del control interno de ARN; donde **C.R.**: producto de colonia recombinante; **D.**: producto de digestión; **L.**: producto de ligación; **M**: marcador de peso molecular; y **N.D.**: producto no digerido. Pesos moleculares expresados en pares de bases.

Dichas moléculas fueron purificadas mediante precipitación (ver apartado 7.8), y ligadas durante 16 h a 4 °C con la enzima ligasa del fago T4 (Roche). Entre todos los productos de ligación resultantes, la molécula de ADN de 135 pb, correspondiente a la ligación de las moléculas de 71 y 64 pb, era la única que aún mantenía las secuencias donde hibridan los cebadores A1 y A2, y por lo tanto, era la única que podía ser amplificada por PCR con dichos cebadores siguiendo las mismas condiciones y programa de PCR como si de un genoma vírico se tratase (Paso 3, Figura 3.1).

Utilizando la enzima *Pwo DNA Polymerase* (Roche) y los cebadores A1 y A2, el producto de ligación de 135 pb se amplificó por PCR, y el amplímero resultante, que tenía extremos romos, fue clonado en el vector *pCAP^s* (Roche) digerido con la enzima de restricción *Mlu NI* (Roche). El producto de clonación fue utilizado para transformar células competentes *Library Efficiency E. coli DH5 α* (Invitrogen) según procedimientos clásicos (ver apartado 7.9) utilizando como antibiótico de selección la ampicilina a una concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$ (Paso 4, Figura 3.1). El vector *pCAP^s* se caracteriza por tener el lugar de clonaje múltiple en medio de la secuencia de un gen letal para las células, de modo que sólo las células que eran transformadas con el vector que había incorporado el amplímero podían multiplicar.

La inserción del amplímero en el vector de células transformadas fue confirmada por PCR con los cebadores P1 (5'-GATCCTAATACGACTCACTATAGAACCGCCTGTGAAGTGC TGAAT-3') y P2 (5'-GATCCATTTAGGTGACACTATAGTGTGCGGAGATCAGGTTCTG ATCCTC-3'), los cuales flanquean el lugar de clonaje múltiple del vector y tienen en sus secuencias los promotores para las enzimas ARN polimerasas de los fagos T7 y SP6 respectivamente. Para ello, varias colonias transformadas fueron resuspendidas en 100 μl de $\text{H}_2\text{O}_{\text{bd}}$ y hervidas durante 5 min. Tras centrifugación a 14.000 g durante 5 min, el plásmido se recuperó a partir del sobrenadante y fue utilizado como molde para la PCR. La enzima utilizada fue la *Pwo DNA Polymerase* (Roche) con el fin de obtener un amplímero con extremos romos. El programa de PCR constó de una desnaturalización inicial de 2 min a 95 °C; 35 ciclos de amplificación desglosados en una desnaturalización de 40 sec a 95 °C, una hibridación de 30 sec a 68 °C y una elongación de 45 sec a 72 °C; y una elongación final de 7 min a 72 °C. Las colonias que tuvieran el fragmento bien insertado darían lugar a un amplímero de 511 pb.

A continuación se determinó la secuencia nucleotídica con el cebador P2 del amplímero de 511 pb obtenido a partir de una colonia recombinante (ver apartado 7.12). En función de la orientación en la que se hubiese insertado el fragmento de 135 pb, se decidiría cual de las dos enzimas ARN polimerasas tenía que ser utilizada para la síntesis del control interno de

ARN de manera que éste tuviera la misma polaridad que el genoma de astrovirus. De este modo, el control interno de ARN sería amplificable por RT-PCR con los cebadores A1 y A2 al igual que el genoma vírico. En nuestro caso resultó ser la enzima ARN polimerasa del fago T7 (Paso 5, Figura 3.1).

Finalmente, para la síntesis del control interno de ARN, 1 µg del amplímero de 511 pb (previamente purificado por precipitación con etanol y acetato sódico) fue transcrito con el *Riboprobe® in vitro Transcription System-T7* (Promega) (ver apartado 7.10), obteniéndose como producto unos 100 ng ARN/µl (Paso 6, Figura 3.1).

3.2.5. RT-PCR Competitiva

Con la síntesis del control interno de ARN ya estábamos en disposición de poner a punto la RT-PCR competitiva con la que cuantificar la carga vírica de astrovirus de cualquier tipo de muestra.

La base teórica de la RT-PCR competitiva consiste en realizar reacciones de RT-PCR de diluciones seriadas de una muestra habiendo añadido a cada dilución una cantidad conocida de moléculas del control interno de ARN.

De este modo, al llevar a cabo la reacción de RT-PCR, el genoma vírico y el control interno de ARN competirán por los cebadores, y de aquel ARN que haya más cantidad, será el que se amplifique mayoritariamente en detrimento del otro. Entre todas las diluciones analizadas de la muestra, habrá una dilución en la que la cantidad de genoma vírico y de control interno de ARN serán similares, y por lo tanto la cantidad de amplímero sintetizado para cada uno de ellos serán equiparables. En esta dilución de la muestra se podrá asumir que la cantidad de genomas víricos será la misma que la de moléculas de control interno de ARN añadidas a la reacción.

La reacción de RT-PCR competitiva se basó en la reacción descrita en el apartado 3.2.3 y obedecía al siguiente protocolo:

- 1.- Los ácidos nucleicos de 50 µl de muestra eran extraídos según el método de Boom y col. (1990) (ver apartado 7.4).
- 2.- La suspensión de ácidos nucleicos era diluida en H₂O_{bd} según una serie dilucional logarítmica de 0.5 log₁₀.

3.- Para cada dilución, 5 µl eran sometidos a un choque térmico de 5 min a 99 °C para deshacer las estructuras secundarias de los genomas víricos.

4.- Tras el choque térmico, a cada dilución de la muestra se añadían 5 µl de la suspensión del control interno de ARN con un número de moléculas conocido (1700 moléculas).

5.- A la mezcla de genomas víricos y control interno de ARN (10 µl) se le añadían 10 µl de la mezcla de RT con la siguiente composición:

§	Tampón <i>M-MLV RT 5X</i>	4 µl
§	dNTP 2 mM.....	2 µl
§	Cebador A2 100 µM.....	2 µl
§	H ₂ O _{bd} esterilizada por autoclave 45 min.....	1.72 µl
§	Inhibidor de ribonucleasas <i>RNasin</i> [®] 30 U/µl.....	0.2 µl
§	<i>M-MLV RT</i> (200 U/µl).....	<u>0.08 µl</u>
		10 µl

6.- Los ADNc del genoma vírico y del control interno de ARN eran obtenidos tras una retrotranscripción de 60 min a 42 °C.

7.- Tras la retrotranscripción, el producto resultante era mezclado con 30 µl de mezcla de PCR con la siguiente composición:

§	Tampón <i>Expand HiFi PCR System 10X</i>	5 µl
§	dNTP 2 mM.....	5 µl
§	Cebador A1 100 µM.....	0.5 µl
§	Cebador A2 100 µM.....	0.5 µl
§	MgCl ₂ 25 mM.....	4 µl
§	H ₂ O _{bd} esterilizada por autoclave 45 min.....	14.85 µl
§	<i>Expand HiFi PCR System</i> (3.5 U/µl).....	<u>0.15 µl</u>
		30 µl

8.- Los ADNc eran amplificados por PCR siguiendo el siguiente ciclo de amplificación:

3 min a 95 °C	} x 40 ciclos
30 sec a 94 °C	
30 sec a 55 °C	
30 sec a 72 °C	
7 min a 72 °C	

9.- De los productos de PCR, 20 μ l eran analizados en un gel de poliacrilamida al 9% (ver apartado 7.7).

10.- Finalmente, el número de genomas de astrovirus presentes en la muestra era estimado a partir de la dilución de la muestra en la que los amplímeros del genoma vírico y del control interno de ARN presentaban la misma intensidad. De este modo se podía asumir que el número de genomas de astrovirus en esa dilución de la muestra era aproximadamente el mismo que el número de moléculas de control interno de ARN añadidas (1700 moléculas).

De este modo, y teniendo en cuenta la dilución de la muestra, volumen analizado y cantidad de moléculas de control interno de ARN añadidas, la cantidad de virus presentes en la muestra se expresaba como número de genomas virales por unidad de volumen.

3.2.6. Preparación de las Muestras Fecales

Un total de 46 muestras fecales de niños con gastroenteritis causada por astrovirus fueron cuantificadas por RT-PCR competitiva. Los astrovirus estaban repartidos entre los serotipos 1, 2, 3, 4 y 8 y los genotipos I-A, II-B, II-E, IV-C, V-D y VI-F. Todas estas muestras se obtuvieron a raíz de un estudio epidemiológico molecular llevado a cabo en la área metropolitana de la ciudad de Barcelona por Guix y col. (2002).

El tiempo que pasó entre la aparición de síntomas y la recolección de muestras fue de 1 a 3 días en el caso de gastroenteritis agudas, y de alrededor de 2 semanas en el caso de gastroenteritis persistentes.

Para llevar a cabo la cuantificación de astrovirus en estas muestras por RT-PCR competitiva, primero se obtuvieron suspensiones fecales al 10% en tampón de suspensión (PBS suplementado con 2M NaNO₃, 1% (p/v) extracto de carne y 0.1% (v/v) Triton X-100). Para ello, 0.1 g de muestra fecal fueron resuspendidos en 0.9 ml de tampón de suspensión. Tras homogeneizar la suspensión durante 1 min, la solución fue centrifugada durante 5 min a 2.000 g recuperando el sobrenadante resultante.

Tras realizar la extracción de ácidos nucleicos de 50 μ l de la suspensión fecal al 10% por el método de Boom y col. (1990) (ver apartado 7.4), 5 μ l de la suspensión de ácidos nucleicos fueron utilizados para realizar la cuantificación de astrovirus por RT-PCR competitiva tal y como se ha descrito en el apartado 3.2.5.

3.3. RESULTADOS

3.3.1. Purificación de Astrovirus en Gradientes de Sacarosa

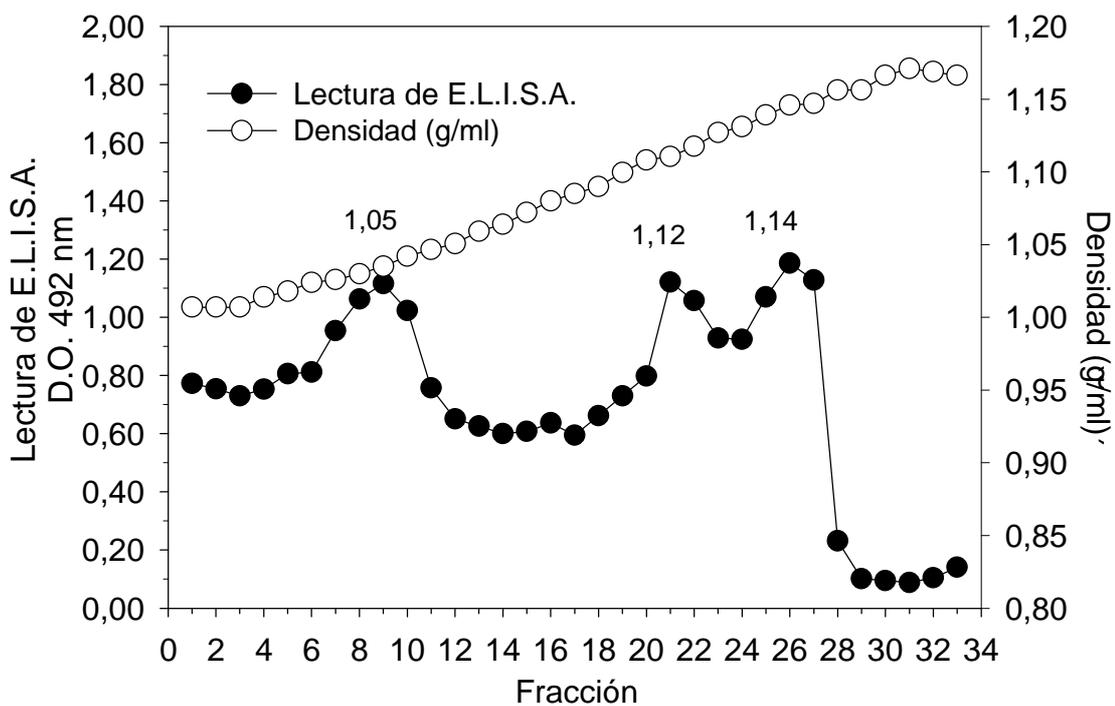
La caracterización de las diferentes fracciones del gradiente de sacarosa mediante E.L.I.S.A. reveló la presencia de tres picos antigénicos con densidades de 1.05, 1.12 y 1.14 g/ml (Figura 3.2).

De entre los diferentes picos antigénicos, la hibridación molecular de ácidos nucleicos con una sonda específica mostró que tanto el pico antigénico de 1.05 g/ml como el de 1.14 g/ml eran positivos para la presencia de genomas de astrovirus, mientras que el pico antigénico de 1.12 g/ml era negativo (Figura 3.2).

Estos resultados nos sugirieron que el pico antigénico de 1.14 g/ml correspondía a partículas víricas con ácido nucleico (virus infecciosos), que el pico antigénico de 1.12 g/ml correspondía a partículas víricas sin ácido nucleico (virus no infecciosos) y que el pico antigénico de 1.05 g/ml correspondía a los componentes víricos aislados.

Para confirmar esta hipótesis, se llevó a cabo la determinación de la infectividad vírica asociada a cada uno de los picos antigénicos mediante CC-RT-PCR. Los resultados pusieron de manifiesto la presencia de 1×10^{10} uCC-RT-PCR/ml en el pico con densidad 1.14 g/ml, de 1×10^8 uCC-RT-PCR/ml en el pico con densidad 1.12 g/ml y de 5×10^7 uCC-RT-PCR/ml en el pico de 1.05 g/ml de densidad.

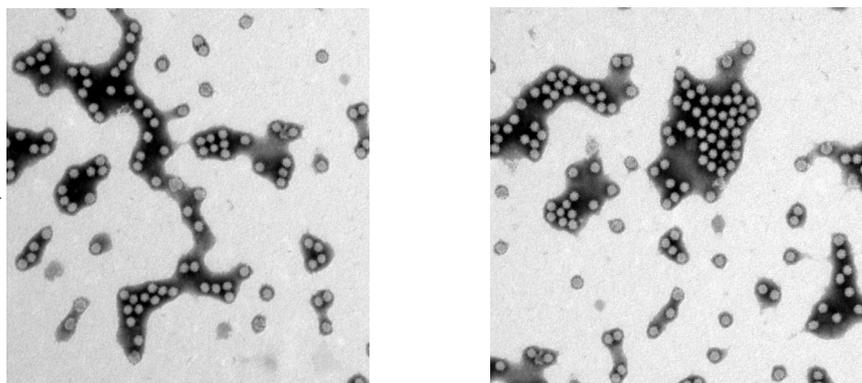
E.L.I.S.A.



Hibridación de ácidos nucleicos →



M.E.T. →



CC – RT-PCR →

1×10^8 uCC-RT-PCR/ml	1×10^{10} uCC-RT-PCR/ml
-------------------------------	----------------------------------

Figura 3.2: Determinación de antigenicidad vírica (**E.L.I.S.A.**), presencia de genomas víricos (**hibridación molecular**), observación de partículas víricas por microscopía electrónica (**M.E.T.**) e infectividad en cultivo celular (**CC-RT-PCR**) de fracciones del gradiente obtenidas en la purificación del HAstV-4.

De este modo se confirmó que el pico con densidad 1.14 g/ml es donde se concentraban mayoritariamente los virus infecciosos, ya que el 98.5% del total de la infectividad detectada se acumulaba en dicho pico. La presencia de infectividad en los dos otros picos antigénicos se podría explicar por la contaminación cruzada entre fracciones que se puede producir a la hora de fraccionar el gradiente (Figura 3.2).

Hasta este momento sólo teníamos pruebas indirectas de que en los picos de 1.14 y 1.12 g/ml había partículas víricas infecciosas y no infecciosas respectivamente, y que el pico con densidad 1.05 g/ml se encontraban los diferentes componentes víricos no estructurados.

Para confirmar definitivamente la presencia de virus en los picos con densidad 1.14 y 1.12 g/ml y su ausencia en el pico con densidad 1.05 g/ml, las fracciones correspondientes a cada pico antigénico fueron observadas bajo microscopio electrónico de transmisión. Los resultados confirmaron nuestras suposiciones, ya que se observó la presencia de partículas víricas, sin ninguna diferencia morfológica aparente, en los dos picos antigénicos de mayor densidad, y la ausencia de partículas víricas en el pico de 1.05 g/ml y (Figura 3.2)

Finalmente, la determinación de la concentración de partículas víricas físicas en los picos de mayor densidad mediante contaje por microscopía electrónica en comparación con una suspensión de partículas de oro coloidal de concentración conocida dio como resultado un título de 3×10^{10} partículas víricas físicas por mililitro para el pico correspondiente a los virus infecciosos y un título de 2×10^{10} partículas víricas físicas por mililitro para el pico de los virus no infecciosos.

Al final de estos experimentos habíamos logrado obtener una suspensión purificada de astrovirus infecciosos con un título de 3×10^{10} virus/ml según M.E.T. y de 1×10^{10} uCC-RT-PCR/ml según el método de infectividad y RT-PCR combinados.

3.3.2. Validación de la RT-PCR Competitiva

Para llevar a cabo la validación de la RT-PCR competitiva como método para la cuantificación de astrovirus se cuantificó la suspensión de astrovirus infecciosos purificados por RT-PCR competitiva y se compararon los resultados con los obtenidos por microscopía electrónica y por infectividad y RT-PCR combinados (CC-RT-PCR).

En un principio se estableció cual era la sensibilidad de la RT-PCR con los cebadores A1 y A2 la cual se iba a utilizar en la cuantificación de astrovirus por RT-PCR competitiva.

Para ello se necesitaba una suspensión de ARN de concentración conocida. La síntesis del control interno de ARN daba lugar a la producción de aproximadamente 100 nm/μl de ARN. Teniendo en cuenta que el tamaño de la molécula del control interno de ARN era de 511 nucleótidos, la cantidad de moléculas presentes en la suspensión de control interno de ARN correspondía aproximadamente a 3.4×10^{11} moléculas de ARN por microlitro.

Para establecer cual era la sensibilidad de la RT-PCR, la suspensión del control interno de ARN fue diluida en H₂O_{bd} según una serie dilucional 1/10, y cada dilución fue sometida a la reacción de RT-PCR. La sensibilidad de la RT-PCR se determinó a partir de la última dilución positiva, y resultó ser de 3.4 moléculas de ARN por microlitro, o lo que era lo mismo, 17 moléculas de ARN por reacción de RT-PCR.

La amplificación por RT-PCR del control interno de ARN con los cebadores A1 y A2 da lugar a un amplímero de 135 pb claramente diferenciable de los amplímeros obtenidos a partir del genoma de astrovirus (entre 192 y 237 pb dependiendo del serotipo) tras electroforesis en geles de poliacrilamida al 9%, pero estas diferencias de tamaño no son significativas para pensar que la amplificación por RT-PCR del control interno de ARN y del genoma vírico de astrovirus presentasen distintas sensibilidades.

Una vez observado que la sensibilidad de la RT-PCR era buena, se valoró si la RT-PCR competitiva daba una cuantificación fidedigna del número de genomas de astrovirus presentes en una muestra. Para ello, se cuantificó por RT-PCR competitiva el número de genomas en la suspensión de astrovirus infecciosos purificada por gradiente de sacarosa que tenía un título de 1×10^{10} uCC-RT-PCR/ml por infectividad en cultivo celular y de 3×10^{10} virus/ml por M.E.T. El resultado obtenido por RT-PCR competitiva fue de 9×10^{10} genomas/ml. En comparación con los títulos obtenidos por CC-RT-PCR y M.E.T., el valor obtenido por RT-PCR competitiva resultó ser ligeramente superior, aunque dentro del mismo orden en una escala logarítmica: $10 \log_{10}$ para CC-RT-PCR, $10.48 \log_{10}$ para M.E.T. y $10.95 \log_{10}$ para RT-PCR competitiva. Este experimento confirmó que la RT-PCR competitiva permitía una cuantificación fidedigna del número de partículas víricas infecciosas presentes en una muestra.

3.3.3. Cuantificación de Astrovirus en Muestras Fecales

Cuarenta y seis muestras fecales de niños con gastroenteritis causada por astrovirus fueron cuantificadas por RT-PCR competitiva. Los parámetros más relevantes asociados a cada una de las muestras cuantificadas se muestran en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1: Parámetros relevantes de las muestras analizadas en el estudio.

Identificación de la muestra	Accession Number	Edad paciente (meses)	Sexo paciente (M/F)	DIAGNÓSTICO ASTROVIRUS			Otros patógenos detectados
				Serotipo	Genotipo - RFLP	E.L.I.S.A.	
Bcn 1.1	AF3487	18	F	1	I - A	n.d.	rotavirus
Bcn 1.3	AF3487	13	M	1	I - A	n.d.	-
Bcn 1.4	AF3487	29	F	1	I - A	+	-
Bcn 1.5	AF3487	13	M	1	I - A	+	-
Bcn 1.9	AF3487	12	F	1	VI - F	+	-
Bcn 1.10	AF3487	24	M	1	VI - F	+	-
Bcn 1.11	AF3487	12	M	1	VI - F	+	-
Bcn 1.12	AF3487	16	F	1	I - A	+	-
Bcn 1.13	AF3487	30	F	1	I - A	n.d.	-
Bcn 1.14	AF3487	7	M	1	VI - F	+	-
Bcn 1.15	AF3487	35	F	1	VI - F	+	<i>Salmonella</i>
Bcn 1.16	AF3487	24	F	1	n.d.	+	-
Bcn 1.17	AF3487	24	M	1	VI - F	+	-
Bcn 1.18	AF3487	5	F	1	I - A	+	-
Bcn 2.1	AF3487	17	M	2	II - B	n.d.	-
Bcn 2.2	AF3487	20	M	2	II - B	+	-
Bcn 2.3	AF3487	15	M	2	II - B	n.d.	-
Bcn 3.1	AF3487	21	F	3	IV - C	+	-
Bcn 3.2	AF3487	21	M	3	IV - C	+	-
Bcn 3.3	AF3487	41	M	3	IV - C	+	-
Bcn 3.4	AF3487	15	M	3	IV - C	+	<i>Candida</i>
Bcn 3.6	AF3487	5	F	3	IV - C	n.d.	-
Bcn 3.7	AF3487	12	F	3	IV - C	+	-
Bcn 3.8	AF3487	7	F	3	IV - C	+	-
Bcn 3.9	AF3487	22	F	3	IV - C	+	-
Bcn 4.1	AF3487	34	F	4	V - D	+	-
Bcn 4.2	AF3487	47	M	4	V - D	+	-
Bcn 4.3	AF3487	83	M	4	V - D	+	-
Bcn 4.4	AF3487	12	M	4	V - D	+	-
Bcn 4.5	AF3487	3	M	4	V - D	+	rotavirus
Bcn 4.6	AF3487	12	M	4	V - D	+	-
Bcn 4.9	AF3487	14	F	4	VI - F	+	<i>Campylobacter</i>
Bcn 4.10	AF3487	68	M	4	VI - F	+	-
Bcn 4.11	AF3487	62	M	4	VI - F	n.d.	-
Bcn 4.12	AF3487	32	F	4	VI - F	+	-
Bcn 8.1	AF3487	47	M	8	II - E	+	-
Bcn 8.2	AF3487	157	M	8	II - E	+	-
Bcn 8.3	AF3487	17	F	8	II - E	+	-
Bcn 8.4	AF3487	32	F	8	II - E	+	-
Bcn 8.5	AF3488	--	--	8	II - E	+	-
Bcn 8.6	AF3488	32	M	8	II - E	+	rotavirus
57/090299	--	23	M	1	I - A	+	-
11/311298	--	13	M	1	I - A	n.d.	-
22/0799	--	162	M	4	V - D	+	-
7/040299	--	13	M	4	V - D	+	<i>Campylobacter</i>
9/040299	--	1	F	2	II - B	+	-

Donde M: masculino; F: femenino; +: positivo; y -: negativo; n.d.: no determinado.

Estos parámetros corresponden a la identificación original de la muestra (Guix y col., 2002), el número de acceso de la muestra en el *GenBank*, la edad y el sexo del paciente, y el resultado de detección de astrovirus en la muestra por tres sistemas de diagnóstico diferentes: serotipado por secuenciación de un fragmento del ORF2 del genoma (Noel y col., 1995), genotipado por secuenciación y RFLP de un fragmento del ORF1a (Guix y col., *manuscrito en preparación*) y detección por serología con el *kit* de E.L.I.S.A. de DAKO Diagnostics específico contra la cápside de astrovirus. La distribución de estas muestras en función del serotipo o del genotipo del virus se muestra en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2: Distribución de las muestras según serotipo o genotipo del virus.

Serotipo	Número de muestras	% total	Genotipo	Número de muestras	% total
1	16	34.78	I-A	9	20.00
2	4	8.70	II-B	4	8.89
3	8	17.39	II-E	6	13.33
4	12	26.09	IV-C	8	17.78
8	6	13.04	V-D	8	17.78
			VI-F	10	22.22

Como ejemplo de los resultados obtenidos en la cuantificación de astrovirus por RT-PCR competitiva, la Figura 3.3 muestra la imagen de un gel de poliacrilamida al 9% en la cual se visualiza la RT-PCR competitiva de la muestra fecal Bcn 8.5. En este caso, la dilución de la muestra a la que la intensidad de fluorescencia es equivalente a la del control interno de ARN es la dilución 10^{-5} . Dado que en la reacción de RT-PCR competitiva se añadieron 1700 moléculas de control interno de ARN a cada dilución de la muestra, se puede asumir que en la dilución 10^{-5} de la muestra hay 1700 copias del genoma del virus, o lo que es lo mismo, 1.7×10^8 genomas víricos en la muestra directa. De esta manera, teniendo en cuenta que el volumen de muestra analizado por RT-PCR competitiva eran 5 μ l de la suspensión de ácidos nucleicos de una dilución 1/10 de la muestra original, se puede llegar a la estimación de que las heces contenían aproximadamente 3.4×10^{11} genomas por gramo de heces.

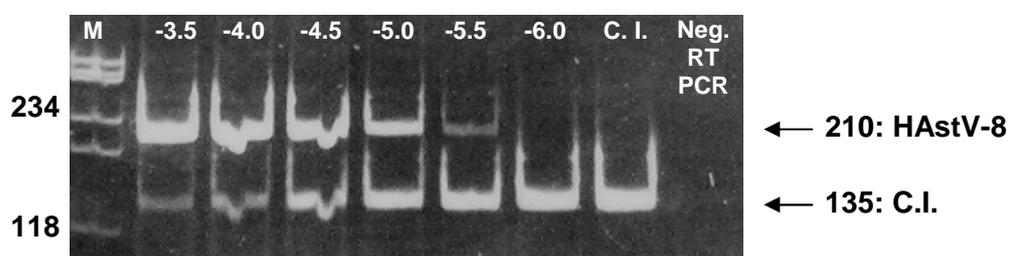


Figura 3.3: Gel de poliacrilamida al 9% con la cuantificación de la muestra Bcn 8.5; donde **C.I.**: control interno de ARN; **M**: marcador de pesos moleculares; y **Neg.**: negativo. Pesos moleculares expresados en pares de bases. Diluciones expresadas en logaritmo en base 10.

De este mismo modo se cuantificaron las 45 muestras restantes, y los resultados de la cuantificación quedan plasmados en la Tabla 3.3.

Tabla 3.3: Valores de las cargas víricas de todas las muestras del estudio.

Muestra	Carga vírica	Log ₁₀ Carga vírica	Muestra	Carga vírica	Log ₁₀ Carga vírica
Bcn 1.1 ^P	3.4 x 10 ⁹	9.53	Bcn 3.8	3.4 x 10 ¹²	12.53
Bcn 1.3	1.0 x 10 ¹⁰	10.01	Bcn 3.9	3.4 x 10 ¹²	12.53
Bcn 1.4	3.4 x 10 ¹⁰	10.53	Bcn 4.1	1.0 x 10 ¹³	13.01
Bcn 1.5	3.4 x 10 ¹⁰	10.53	Bcn 4.2	3.4 x 10 ¹²	12.53
Bcn 1.9	1.0 x 10 ¹¹	11.01	Bcn 4.3	3.4 x 10 ¹⁰	10.53
Bcn 1.10	3.4 x 10 ⁹	9.53	Bcn 4.4	1.0 x 10 ¹²	12.01
Bcn 1.11	3.4 x 10 ¹⁰	10.53	Bcn 4.5 ^P	1.0 x 10 ⁹	9.01
Bcn 1.12	3.4 x 10 ⁸	8.53	Bcn 4.6	3.4 x 10 ¹¹	11.53
Bcn 1.13	3.4 x 10 ⁸	8.53	Bcn 4.9 ^P	1.0 x 10 ⁸	8.01
Bcn 1.14	3.4 x 10 ⁹	9.53	Bcn 4.10	3.4 x 10 ¹⁰	10.53
Bcn 1.15 ^P	1.0 x 10 ⁹	9.01	Bcn 4.11	3.4 x 10 ⁸	8.53
Bcn 1.16	3.4 x 10 ⁹	9.53	Bcn 4.12	1.0 x 10 ⁹	9.01
Bcn 1.17	3.4 x 10 ¹¹	11.53	Bcn 8.1	3.4 x 10 ¹¹	11.53
Bcn 1.18	3.4 x 10 ⁹	9.53	Bcn 8.2	1.0 x 10 ¹¹	11.01
Bcn 2.1	3.4 x 10 ¹¹	11.53	Bcn 8.3	3.4 x 10 ¹⁰	10.53
Bcn 2.2	3.4 x 10 ¹⁰	10.53	Bcn 8.4	3.4 x 10 ⁹	9.53
Bcn 2.3	3.4 x 10 ¹⁰	10.53	Bcn 8.5	3.4 x 10 ¹¹	11.53
Bcn 3.1	3.4 x 10 ¹¹	11.53	Bcn 8.6 ^P	1.0 x 10 ¹¹	11.01
Bcn 3.2	3.4 x 10 ¹²	12.53	57/090299	3.4 x 10 ¹⁰	10.53
Bcn 3.3	3.4 x 10 ¹⁰	10.53	11/311298	3.4 x 10 ¹¹	11.53
Bcn 3.4 ^P	3.4 x 10 ¹¹	11.53	22/0799	1.0 x 10 ⁹	9.01
Bcn 3.6	1.0 x 10 ¹¹	11.01	7/040299 ^P	1.0 x 10 ⁸	8.01
Bcn 3.7	1.0 x 10 ¹³	13.01	9/040299	1.0 x 10 ¹⁰	10.01

Títulos expresados en número de genomas por gramo de muestra tanto en su valor entero como logarítmico; donde ^P: detección de otros patógenos infecciosos diferentes a astrovirus en las heces del paciente.

La carga vírica media de las muestras fue de 10.53 log₁₀ genomas/g de heces con una desviación estándar de 1.33 log₁₀, y un error estándar de 0.20 log₁₀. A pesar de que, en base a los volúmenes de muestra utilizados en la reacción de RT-PCR competitiva, el número mínimo de genomas víricos por gramo de heces necesario para poder ser cuantificado era de 3.53 log₁₀, las cargas víricas de las heces siempre fueron superiores a 8.01 log₁₀ con un valor máximo de 13.01 log₁₀ genomas/g de heces.

3.3.4. Análisis de los resultados según el serotipo

Si las muestras se agrupaban según el serotipo del virus, los resultados de la cuantificación correspondientes al número de muestras para cada serotipo, la media, la desviación estándar y el error estándar que se obtenían son los que se plasman en la Tabla 3.4.

No se tuvieron en cuenta a la hora de realizar el análisis estadístico de los datos aquellas muestras donde se detectaron más de un patógeno al no poderse asegurar que el agente causal de la gastroenteritis fuese astrovirus.

Tabla 3.4: Resultados de la cuantificación de astrovirus en las muestras agrupadas por serotipo.

Serotipo	Número de muestras	Media de la carga vírica	Desviación estándar	Error estándar
1	14	10.10	0.96	0.26
2	4	10.65	0.64	0.32
3	7	11.95	0.93	0.35
4	9	10.74	1.64	0.55
8	5	10.83	0.84	0.37

Títulos expresados en número de genomas por gramo de heces en escala logarítmica en base 10.

Los resultados muestran que la media de la carga vírica correspondiente al serotipo 3 fue netamente superior a la del resto de serotipos.

El estudio del análisis de la varianza (ANOVA) aplicando el test LSD (*least significant difference*) con una probabilidad de error del 0.05 ($p\text{-value} < 0.05$) confirmó la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre el serotipo 3, de mayor carga vírica, y los serotipos 1 y 4, de cargas menores. Respecto a los serotipos 2 y 8, el bajo número de muestras disponibles para estos serotipos hizo que sus intervalos de confianza fuesen tan amplios que no se pudieran establecer diferencias estadísticamente significativas en la carga vírica entre estos dos serotipos y el serotipo 3, a pesar de que la media del serotipo 3 era netamente superior a la de los otros dos serotipos (Figura 3.4).

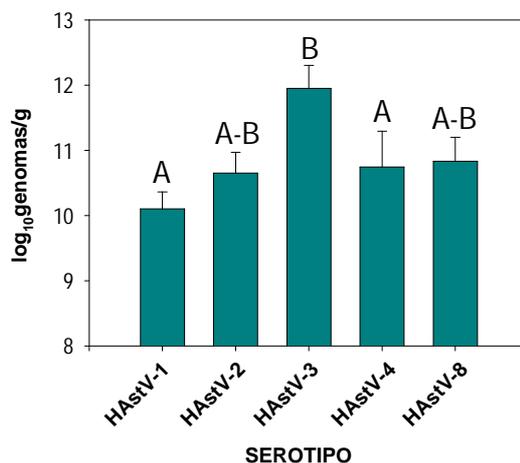


Figura 3.4: ANOVA de las cargas víricas de las muestras agrupadas por serotipo. Títulos expresados en número de genomas por gramo de heces \pm error estándar expresado en escala logarítmica en base 10. Las letras sobre las barras muestran los grupos homogéneos.

3.3.5. Análisis de los resultados según el genotipo

Cuando este análisis estadístico se realizó agrupando las muestras según su genotipo, los resultados obtenidos son los que muestran la Tabla 3.5.

Tabla 3.5: Resultados de la cuantificación de astrovirus en las muestras agrupadas por genotipos

Genotipo	Número de muestras	Media de la carga vírica	Desviación estándar	Error estándar
I - A	8	9.97	1.05	0.37
II - B	4	10.65	0.64	0.32
II - E	5	10.83	0.84	0.37
IV - C	7	11.95	0.93	0.35
V - D	6	11.44	1.46	0.60
VI - F	3	10.03	1.04	0.37

Títulos expresados en número de genomas por gramo de heces en escala logarítmica en base 10.

Los resultados muestran que la media de la carga vírica correspondiente a los genotipos IV - C y V - D era netamente superior a la del resto de genotipos.

En este caso, el estudio ANOVA confirmó las diferencias significativas entre los genotipos IV - C y V - D respecto a los genotipos I - A y VI - F (p -value < 0.05), siendo la carga vírica de los primeros superior a la de los segundos (Figura 3.5). Nuevamente, el bajo número de muestras disponibles para el genotipo II, tanto para el patrón B como E, hizo que no se pudieran establecer diferencias significativas entre éstos respecto a los genotipos IV - C y V - D a pesar de que la media de estos últimos era superior a la de los primeros.

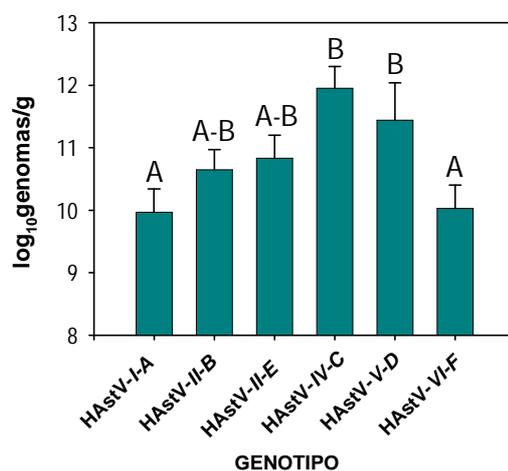


Figura 3.5: ANOVA de las cargas víricas de las muestras agrupadas por genotipo. Títulos expresados en número de genomas por gramo de heces expresado en escala logarítmica en base 10. Las letras sobre las barras muestran los grupos homogéneos.

También se observó que los diferentes genotipos en que se agrupaban las muestras pertenecientes al serotipo 4, genotipos *V - D* y *VI - F*, tenían cargas víricas claramente diferentes siendo la del primero superior a la del segundo.

Por contra, el serotipo 1 también agrupaba sus aislados en dos genotipos diferentes, *I - A* y *VI - F*, pero en este caso no se observó diferencia de carga vírica entre ellos.

Del mismo modo, los serotipos que se englobaban dentro del genotipo *II*, el HAstV-2 y el HAstV-8, presentaban cargas víricas prácticamente idénticas.

3.3.6. Fiabilidad de los resultados

Para confirmar que las diferencias detectadas en las cargas víricas no se debían a diferencias en la eficiencia de hibridación de los cebadores A1 y A2 con los genomas o los ADNc de los diferentes serotipos o genotipos, se compararon las secuencias nucleotídicas de cebadores y de genomas o ADNc del virus gracias a la utilización de cebadores externos.

La comparación de secuencias nos muestra la homología de secuencia entre ambos, de modo que a más diferencias entre cebador y genoma o ADNc, más difícil resulta la hibridación entre ellos y viceversa.

Las secuencias de los cebadores y las zonas homólogas del genoma vírico o ADNc están plasmadas en las Tablas 3.6 y 3.7.

Dichos resultados mostraron que las diferencias entre los cebadores y el genoma vírico o el ADNc del genoma en ningún caso fue superior a 2 nucleótidos a excepción para el genotipo *I - A* en el cual se encontraron 6 diferencias en el ADNc con respecto al cebador A1. En consecuencia, podemos asumir que la RT-PCR era igualmente eficiente para todos los serotipos o genotipos, con la posible excepción en la amplificación por PCR del ADNc del genotipo *I - A* (serotipo 1). Con el fin de determinar si este número de diferencias podría haber desvirtuado los resultados obtenidos para la cuantificación de virus del genotipo *I - A*, se volvieron a cuantificar estas muestras, pero esta vez utilizando un cebador A1 completamente homólogo a la secuencia de la región de hibridación del genoma.

Tabla 3.6: Diferencia de secuencia entre el cebador A1 y su zona correspondiente en el ADNc del genoma de los diferentes grupos de astrovirus.

Muestra	Secuencia	Número de diferencias
Cebador A1	5'-CCTGCCCCGAGAACAACCAAGC-3'	
Serotipo 1 Genotipo I - A	5'-CCTGCCCCT CGGT CAATCAAAC-3'	6
Serotipo 1 Genotipo VI - F	5'-CCTGCCCCGAGAACAACCAA AT -3'	2
Serotipo 4 Genotipo VI - F	5'-CCTGCCCCGAGAACAACCAA AT -3'	2
Serotipo 2 Genotipo II - B	5'-CCTGCCCCTAGAACAA CAAGC -3'	2
Serotipo 8 Genotipo II - E	5'-CCTGCCCCTAGAACAA CAAGC -3'	2
Serotipo 3 Genotipo IV - C	5'-CCTGCCCCGAGAG G CAATCAAGC-3'	2
Serotipo 4 Genotipo V - D	5'-CC C GCCCCGAGAACAACCAAGC-3'	1

En negrita se remarcan las diferencias.

Tabla 3.7: Diferencia de secuencia entre el cebador A2 y su zona correspondiente en el genoma de los diferentes grupos de astrovirus.

Muestra	Secuencia	Número de diferencias
Cebador A2	5'-GTAAGATTCCCAGATTGGTGC-3'	
Serotipo 1 Genotipo I - A	5'- ATA AGATTCCCAGATTGGTGC -3'	1
Serotipo 1 Genotipo VI - F	5'- ATA AGATTCCCAGATTGGTGC -3'	1
Serotipo 4 Genotipo VI - F	5'- ATA AGATTCCCAGATTGGTGC -3'	1
Serotipo 2 Genotipo II - B	5'- ATA AGATTCCCA AA TTGGTGC -3'	2
Serotipo 8 Genotipo II - E	5'- ATA AGATTCCCA AA TTGGTGC -3'	2
Serotipo 3 Genotipo IV - C	5'- ATA AGATTCCCAGATTGG CGC -3'	2
Serotipo 4 Genotipo V - D	5'- ATA AG ACT CCCAGATTGGTGC -3'	2

En negrita se remarcan las diferencias.

La media y la desviación estándar que se obtuvieron en la nueva cuantificación fue de 10.45 ± 0.24 . Esta media fue ligeramente superior a la obtenida en un principio, 9.97 ± 0.53 , pero aplicando un estudio de ANOVA, esta diferencia no era estadísticamente significativa ($p\text{-value} > 0.05$), con lo que el valor obtenido en un principio podía considerarse correcto.

También se intentó buscar diferencias significativas en las cargas víricas agrupando las muestras por edad o por sexo, pero en ninguno de los dos casos un grupo presentaba una carga vírica superior respecto al otro.

3.3.7. Resultados de las muestras con coinfección

Con respecto a las siete muestras en las que además de astrovirus se encontraron otros patógenos, cabe destacar que sólo en tres de ellas el número de genomas detectados quedó dentro de los límites que marcaban los intervalos de confianza correspondientes a su mismo serotipo o genotipo (Tabla 3.8).

De ellas, dos muestras pertenecían a los serotipos 3 y 8 (genotipos *IV - C* y *II - E*), que justamente se correspondían con aquellos grupos en los que la carga vírica media se situaba entre las más elevadas, lo que sugiere que en estos casos el astrovirus podía haber sido el agente causal primario de la gastroenteritis. Por el contrario, en el resto de los casos, la infección por astrovirus podía considerarse secundaria acentuando la sintomatología producida por la infección causada por el otro patógeno.

Tabla 3.7: Cargas víricas de las muestras con otros patógenos además de astrovirus.

Muestra	Carga vírica	Serotipo	Intervalo de confianza 95%	Genotipo	Intervalo de confianza 95%
Bcn 1.1	9.53	1	9.49 - 10.71	I - A	9.21 - 10.72
Bcn 1.15	9.01	1	9.49 - 10.71	VI - F	9.27 - 10.78
Bcn 3.4	11.53	3	11.09 - 12.81	IV - C	11.15 - 12.76
Bcn 4.5	9.01	4	9.98 - 11.50	V - D	10.57 - 12.31
Bcn 4.9	8.01	4	9.98 - 11.50	VI - F	9.27 - 10.78
Bcn 8.6	11.01	8	9.81 - 11.84	II - E	9.87 - 11.78
7/040299	8.01	4	9.98 - 11.50	V - D	10.57 - 12.31

Títulos expresados en número de genomas por gramo de muestra en escala logarítmica en base 10. En negrita se remarcan las muestras que entran dentro de los intervalos de confianza de su serotipo o genotipo

3.3.8. Correlación entre serotipo/genotipo y severidad de la gastroenteritis

Finalmente, se intentó correlacionar los casos de mayor severidad en la sintomatología de la gastroenteritis con un serotipo o genotipo del virus en concreto.

En base a los historiales clínicos de los pacientes, las gastroenteritis se clasificaron en agudas, aquellas en las que la sintomatología desaparecía dentro de la primera semana desde el inicio de los síntomas, y en persistentes, aquellas en las que la sintomatología se prolongaba más allá de una semana.

En el estudio epidemiológico realizado en Barcelona (Guix y col., 2002) se detectaron astrovirus en un total de 116 muestras. De ellas, un total de 94 muestras fueron positivas únicamente para astrovirus, de las cuales el 8.5% (8 de 94 totales) fueron diagnosticadas como gastroenteritis persistentes.

En el 37.5% de los casos (3 de 8 totales), la gastroenteritis persistente estaba asociada con el serotipo 3 (genotipo *IV* - C). El resto de gastroenteritis persistentes se relacionó en un 12.5% (1 de 8 totales) con el serotipo 1, en otro 12.5% (1 de 8 totales) con el serotipo 8 (genotipo *II* - E) y en el 37.5% restante (3 de 8 totales) de los casos no se pudo determinar ni el serotipo ni el genotipo del virus.

3.4. DISCUSIÓN

Este trabajo aporta el primer estudio en el que se cuantifica la carga vírica de astrovirus en muestras fecales.

Para la consecución de este trabajo se ha puesto a punto una RT-PCR competitiva que permite determinar el número de genomas víricos presentes en cada muestra. La idoneidad y fiabilidad de esta técnica fue validada con una suspensión de astrovirus infecciosos purificados de concentración conocida y contrastada con otras técnicas descritas para la cuantificación de virus como la microscopía electrónica y la RT-PCR integrada a cultivo celular.

La obtención de astrovirus purificados se realizó mediante gradientes de sacarosa. A diferencia de los gradientes de CsCl que separan en función de la densidad de la partícula vírica, los gradientes de sacarosa separan las partículas víricas en función del peso, por lo que pequeñas variaciones en la composición de las partículas víricas (presencia o ausencia de genoma) se corresponde con cambios en el bandeo de los virus dentro del gradiente.

Siguiendo nuestro método de purificación, se pudo determinar que los astrovirus infecciosos (con ácido nucleico) bandean a una densidad de 1.14 g/ml. Existen pocos datos sobre la purificación de astrovirus con gradientes de sacarosa, y una discusión más exhaustiva de los resultados obtenidos en comparación con otros métodos de purificación será llevada a cabo en el Estudio III de esta tesis doctoral donde se trata en profundidad la purificación de astrovirus y de partículas *virus-like* (VLPs) de astrovirus.

En el presente estudio se ha descrito por primera vez una RT-PCR competitiva que sirve para cuantificar el número de astrovirus presentes en una muestra mediante una técnica molecular sin la necesidad de tener que expresar los valores obtenidos en unidades arbitrarias. A diferencia de la RT-PCR clásica o la RT-PCR integrada a cultivo celular, la RT-PCR competitiva nos ha permitido expresar las cargas víricas en unidades definidas como son número de genomas por gramo de heces.

La RT-PCR competitiva, basada en la utilización del control interno de ARN, además de permitir la cuantificación de virus también ofrece otra serie de ventajas frente a las RT-PCR clásicas (Kleiboeker, 2003):

- Ø la detección de inhibidores de RT-PCR en cada una de las reacciones ensayadas por la falta de amplímero, ya sea del genoma vírico o del control interno de ARN, y evitar por lo tanto los falsos negativos,
- Ø la utilización del control interno de ARN como control positivo de RT-PCR en vez del virus evitando que se produzcan contaminaciones cruzadas derivadas de su presencia no detectables (falsos positivos),
- Ø y la utilización del control interno de ARN como referencia de los niveles de recuperación de ácidos nucleicos tras el proceso de extracción.

La sensibilidad mostrada por nuestra RT-PCR competitiva resultó ser de 17 moléculas de control interno de ARN por reacción, valores que están en consonancia con los obtenidos por otros autores para otras RT-PCR competitivas diseñadas para la cuantificación de virus como Norwalk, Hepatitis A y Rotavirus grupo A (Atmar y col., 1995; y Schwarz y col., 2002).

Con posterioridad a la realización de este estudio, se publicó un trabajo en el que se cuantificaba la carga de astrovirus en aguas residuales mediante RT-PCR a tiempo real (Le Cann y col., 2003). La sensibilidad de la RT-PCR a tiempo real resultó ser de 26 moléculas de ARN por reacción, valor similar al obtenido con nuestra RT-PCR competitiva.

Las desventajas de la RT-PCR a tiempo real frente a la RT-PCR competitiva son una mayor dificultad de la puesta a punto de la técnica y la necesidad de instrumental y reactivos económicamente costosos. Sin embargo es una técnica que presenta importantes ventajas como la menor manipulación de las muestras, la automatización de la técnica y una mayor exactitud en la cuantificación de las cargas víricas, aunque los resultados obtenidos para una misma muestra son equiparables independientemente de la técnica empleada, RT-PCR a tiempo real o RT-PCR competitiva (Kleiboeker, 2003).

De los resultados obtenidos en la cuantificación de astrovirus en las muestras fecales se concluye que la carga vírica media de astrovirus excretados durante un episodio de gastroenteritis es aproximadamente de 3.4×10^{10} ($10.53 \log_{10}$) virus por gramo de heces, pudiéndose encontrar entre 10^8 y 10^{13} virus por gramo de heces.

Cabe destacar que la cantidad de virus excretados por los pacientes es significativamente diferente en función del serotipo o genotipo de astrovirus causante de la infección. De este modo, se ha constatado que las heces de pacientes infectados por astrovirus pertenecientes al serotipo 3 (genotipo *IV* - C) presentan una carga vírica superior al del resto de serotipos y genotipos (a excepción del genotipo *V* - D). El serotipo 3 (genotipo *IV* - C) se excreta en unas concentraciones medias de casi $12 \log_{10}$ virus por gramo de heces mientras que para el resto de serotipos y genotipos (a excepción del genotipo *V* - D) los niveles de excreción no alcanzan los $11 \log_{10}$ virus por gramo de heces.

No se sabe si la mayor producción de progenie vírica de unos serotipos o genotipos respecto a otros está ligada a un fenómeno relacionado con la capacidad de interacción de los virus con el o los receptores celulares, o si por el contrario depende de las características de otras proteínas no estructurales como las codificadas por el ORF1a con una potencial función en la adaptabilidad de astrovirus a cultivos celulares y en la replicación del genoma vírico (Willcocks y col., 1994; y Guix y col., 2004b).

El significado clínico de las elevadas cargas víricas excretadas en las heces de individuos infectados con HAstV-3 (genotipo *IV* - C) no está claro pero es interesante destacar la correlación encontrada entre este hecho y los casos de gastroenteritis persistentes.

La asociación de infecciones por astrovirus con episodios sin síntomas de gastroenteritis ha sido demostrada en varias ocasiones (Méndez-Toss y col., 2004). Sin embargo, la relación directa entre astrovirus y diarreas persistentes no está tan clara, y menos aún su asociación con un serotipo o genotipo del virus concreto.

En este trabajo hemos observado que en un 8.5% de los casos (8 casos de 94 totales) la gastroenteritis evolucionó a persistente, y dentro de este porcentaje, el 37.5% de los casos (3 casos de 8 totales) se asociaron con el serotipo 3 (genotipo *IV* - C).

La asociación entre infecciones por astrovirus y gastroenteritis persistentes ya se observó en un estudio en Bangladesh (Unicomb y col., 1998) donde en un 15% de las diarreas persistentes diagnosticadas (23 casos de 153 totales) el agente infeccioso causal era

astrovirus, si bien las condiciones sanitarias e infraestructuras del país (en vías de desarrollo) pudieron influenciar sobre la severidad de la sintomatología de la enfermedad.

Especial atención merece los casos de pacientes inmunosuprimidos (por trasplantes, enfermedades inmunológicas o SIDA) que son infectados por astrovirus. En estos casos, los episodios de gastroenteritis persistentes son más frecuentes y pueden llegar a acelerar la muerte del paciente por deshidratación si no son tratadas a tiempo (Kurtz y Lee, 1987). Un estudio realizado en una unidad de pediatría con pacientes que habían sido sometidos a un trasplante de médula ósea describe casos de gastroenteritis prolongadas causadas por HAstV-1 con excreción de grandes cantidades de virus en las heces (Cubbit y col., 1999).

En otro estudio, una infección por astrovirus produjo diarrea persistente con excreción elevada de virus en heces ($> 10^{14}$ virus por mililitro de heces) en un paciente adulto que, al padecer de macroglobulinemia de Waldenstrom, había sido tratado con fludarabina. Este paciente mejoró su estado gracias a la administración de inmunoglobulina intravenosa (Björkholm y col., 1995).

En resumen, y teniendo en cuenta tanto los resultados de este trabajo como la bibliografía existente al respecto, parece clara la relación entre gastroenteritis persistentes y la excreción de grandes cantidades de astrovirus en heces. Respecto a la asociación entre el HAstV-3 (genotipo IV - C) y las gastroenteritis persistentes, si bien nuestros datos apuntan hacia la misma, es necesario realizar un estudio mucho más exhaustivo con un número de muestras mayor para confirmar esta tendencia.

Las elevadas cargas víricas y las diarreas persistentes asociadas al HAstV-3 (genotipo IV - C) pueden no ser sólo interpretadas como una mayor capacidad de replicación del virus, sino también como una estrategia del virus para escapar a la respuesta inmune del paciente. En este sentido, las inmunoglobulinas específicas frente al virus juegan un papel importante para el control de la infección. Cualquier mecanismo que provoque que la cantidad de inmunoglobulinas no sea suficiente para controlar la infección, como elevadas cargas virales durante largos periodos de tiempo o deficiencias en el sistema inmunitario, podría hacer que la infección vírica desencadene diarreas severas o prolongadas con el consecuente peligro para el paciente.

A nivel práctico, y vistos los resultados obtenidos, sería interesante que en los hospitales se introdujera la detección de astrovirus en pacientes con gastroenteritis de manera rutinaria así como el serotipado y/o genotipado del virus.

En primer lugar porque en la actualidad es importante disponer de datos epidemiológicos de todos los agentes causantes de gastroenteritis, y adicionalmente, la determinación de la causalidad de la enfermedad por un serotipo 3, genotipo IV – C, de astrovirus puede alertar de una posible persistencia de la gastroenteritis. Con estos datos se podría actuar de modo preventivo realizando un seguimiento y un tratamiento del paciente de forma que se evitasen problemas mayores de salud derivados de la gastroenteritis. Esto sería especialmente aconsejable en pacientes que sufrieran una enfermedad de mayor gravedad y que les supusiera un estado de inmunosupresión. A este nivel, donde la gastroenteritis pueden prolongarse durante semanas, incluso sería aconsejable realizar un seguimiento de las cargas víricas excretadas en heces con el fin de observar si el tratamiento al que se está sometiendo el paciente es efectivo o no.

Finalmente, este estudio abrió la puerta a un conjunto de preguntas claves. ¿Qué característica de los astrovirus condiciona que la cantidad de virus excretados en heces sea diferente entre unos serotipos o genotipos y otros? ¿Se trata de un fenómeno relacionado con las propiedades antigénicas de la cápside y de unión del virus al receptor celular o bien intervienen otras proteínas del virus relacionadas con la replicación vírica? Estas preguntas fueron la base que nos impulsó a la realización del Estudio II de esta tesis doctoral.

4. ESTUDIO II:

**RELACIÓN DE LA VARIABILIDAD DE LA PROTEÍNA nsP1a/4 DE
ASTROVIRUS CON LA REPLICACIÓN DEL GENOMA VÍRICO**

4.1. ANTECEDENTES

Tras haber constatado en el estudio anterior que existen diferencias en función del serotipo y/o genotipo de astrovirus con relación al número de partículas víricas excretadas en las heces de pacientes con gastroenteritis, y que estas diferencias pueden correlacionarse con una mayor o menor severidad de la sintomatología de la enfermedad, el siguiente objetivo de esta tesis doctoral fue estudiar qué factor o factores podían estar relacionados con la variabilidad en la capacidad replicativa del virus.

Al tratarse de un estudio relacionado con la replicación del virus, nuestro trabajo se enfocó en el análisis del ORF1a del genoma de astrovirus, región a partir de la que se traducen varias proteínas no estructurales del virus y donde existen regiones de elevada variabilidad entre diferentes genotipos de astrovirus. Se descartó el estudio del ORF1b ya que la ARN polimerasa está altamente conservada entre los diferentes serotipos o genotipos.

El producto proteico obtenido a partir del ORF1a, llamado nsP1a, es una poliproteína de unos 102 kDa que se genera tras un procesamiento proteolítico de la superproteína nsP1a/1b de 160 kDa.

La superproteína nsP1a/1b se genera a partir de la traducción de las primeras dos terceras partes del genoma del virus (ORF1a y ORF1b). Cuando la traducción del ORF1a se acaba, un fenómeno de *ribosomal frameshifting* entre el ORF1a y el ORF1b permite que se continúe con la traducción del ORF1b dando lugar a la superproteína (Jiang y col., 1993; y Marczinke y col., 1994).

Los puntos exactos de corte de la superproteína nsP1a/1b, así como los de las poliproteínas nsP1a y nsP1b resultantes de su procesamiento, no están claros. Tampoco se sabe si estos cortes son llevados a cabo por proteasas celulares o la proteasa vírica. Son varias las propuestas encontradas en la bibliografía al respecto (Geigenmüller y col., 2002a; Kiang y Matsui, 2002; y Méndez y col., 2003).

La proteína nsP1a es procesada en un mínimo de cuatro productos finales (nsP1a/1, nsP1a/2, nsP1a/3 y nsP1a/4), y la función de la mayoría de dichos productos proteicos es aún desconocida. En la teórica proteína nsP1a/2 se ha observado la presencia de varios dominios transmembrana posiblemente relacionados con el anclaje del complejo de replicación del genoma vírico a membranas. En la proteína nsP1a/3 se encuentra un motivo de *3C serine protease* (PRO). A nivel de la proteína nsP1a/4 se ha detectado una señal de localización nuclear (NLS), un epítipo inmunoreactivo (IRE), una región hipervariable (HVR) y un *death domain* (DD) (Jiang y col., 1993; Matsui y col., 1993; Willcocks y col., 1994a; Méndez-Toss y col., 2000; Oh y Schreier, 2001; Jonassen y col., 2003, Guix y col., 2004a) (ver Figura 1.3, página 15).

En general, la secuencia nucleotídica de los ORF1a y ORF1b está bien conservada entre los diferentes serotipos y/o genotipos de astrovirus con la excepción de la región hipervariable (HVR) del ORF1a situada en el interior de la zona codificante para la proteína nsP1a/4. En su día, Willcocks y col. (1994a) asociaron una delección de 45 nucleótidos en esta región con la adaptación y replicación *in vitro* del virus sobre ciertas líneas celulares. Guix y col. (*manuscrito en preparación*) han establecido un método de clasificación de astrovirus en diversos genotipos en base a la variabilidad detectada en dicha región hipervariable. Las diferencias más significativas entre los diferentes genotipos corresponden a la presencia de inserciones y/o deleciones de aminoácidos y a la variabilidad en el número y posición de potenciales lugares susceptibles de modificaciones post-traduccionales como fosforilación y/o glicosilación.

A la proteína nsP1a/4 se le ha asignado unos pesos moleculares teóricos entre 40.1 y 30.6 kDa (Geigenmüller y col., 2002a; Kiang y Matsui, 2002). Recientemente, Guix y col. (2004b) han descrito, mediante la utilización de anticuerpos específicos frente el extremo carboxi-terminal de la proteína nsP1a/4, la detección de una proteína de 38 kDa, que se corresponde con el peso molecular teórico de la nsP1a/4, y de al menos tres bandas con distinta movilidad electroforética, entre 26 y 24 kDa, que sugieren un procesamiento posterior de la proteína nsP1a/4 y de diferentes niveles de modificaciones post-traduccionales del producto resultante (Guix y col., 2004b).

En el mismo trabajo, Guix y col. demostraron que, tras la infección de la línea celular CaCo-2 con astrovirus, dicha proteína presentaba una localización citoplasmática con predominio en la región perinuclear, y una colocalización con el genoma vírico y con el retículo endoplasmático.

El análisis de la proteína a nivel computacional a partir de las cinco secuencias completas de astrovirus disponibles en el *GeneBank* revela la presencia de regiones acídicas ricas en glutaminas y prolinas, potenciales lugares de glicosilación y fosforilación, así como señales de anclaje al retículo. Además, proteínas relacionadas con la replicación y la transcripción del genoma vírico en otras familias de virus presentan secuencias similares a la nsP1a/4 de astrovirus (Guix y col., 2004b).

Todos estos estudios sugieren cierto papel de la proteína nsP1a/4 de astrovirus en la replicación del genoma del virus, si bien no se ha demostrado de forma directa.

Con este conjunto de antecedentes, este trabajo se ha centrado en confirmar la relación de la variabilidad de la proteína nsP1a/4 con la diferente capacidad replicativa entre los genotipos de astrovirus.

La estrategia a seguir fue estudiar las diferencias entre diferentes clones de astrovirus que sólo difirieran en la secuencia de la proteína nsP1a/4 con respecto a la cantidad sintetizada de los diferentes ARN víricos y a la producción de virus infecciosos.

Los diferentes virus se obtuvieron mediante mutagénesis a partir de un clon de ADNc del genoma de HAsV-1 sustituyendo la secuencia codificante de la proteína nsP1a/4 del clon por las secuencias equivalentes de diferentes genotipos de astrovirus amplificadas por RT-PCR a partir de virus aislados en heces de pacientes con gastroenteritis.

Una vez conseguidos los diferentes clones, y a partir de extractos celulares infectados con los diferentes virus recombinantes, se determinó la cantidad de ARN genómico, ARN subgenómico y ARN anti-genómico, así como los niveles de producción de virus infecciosos en la progenie vírica.

De este modo, si se observan diferencias en las capacidades replicativas de los virus, éstas serían debidas exclusivamente a las diferencias en la secuencia de la proteína nsP1a/4.

Finalmente se realizó un análisis computacional de las secuencias aminoacídicas de las proteínas nsP1a/4 de los diferentes clones con el fin de intentar establecer una relación causa/efecto entre las propiedades biológicas de la proteína y la capacidad replicativa del virus.

4.2. MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1. Líneas Celulares

A lo largo de este estudio se utilizó la línea celular CaCo-2 para propagar los diferentes virus recombinantes. La línea celular BHK-21 se utilizó para la obtención de los diferentes virus recombinantes mediante transfección de los genomas víricos. En el apartado 7.1.1 se detallan la manipulación y las características de las líneas celulares.

4.2.2. Construcción de Astrovirus Recombinantes para la Proteína nsP1a/4

El estudio se inició con la construcción de los diferentes astrovirus recombinantes que sólo se diferenciaban en la región del genoma codificante para la proteína nsP1a/4.

Para ello, se realizaron experimentos de mutagénesis sobre el vector pAVIC6 (cedido gentilmente por S. M. Matsui del VA Palo Alto Health Care System, Palo Alto, USA). Este vector se caracteriza por tener clonado el ADNc del genoma completo del HAstV-1 (Acc. Nº L23513) justo detrás del promotor de la ARN polimerasa del fago T7. Si el vector es digerido con la enzima de restricción Xho I, se puede obtener, mediante transcripción *in vitro* con la ARN polimerasa de T7, moléculas de ARN equivalentes al genoma de HAstV-1. Cuando dichos ARN son transfectados al interior de células CaCo-2 o BHK-21, tiene lugar la producción de partículas infecciosas de astrovirus (Geigenmüller y col., 1997).

Los experimentos de mutagénesis consistieron en la sustitución de la región del clon del pAVIC6 comprendida entre los nucleótidos 1652 y 2614 (963 nt), región codificante para la

proteína nsP1a/4, por la molécula de ADN equivalente de cepas salvajes de astrovirus correspondientes a los genotipos IV - C, V - D y VI - F. Las moléculas de ADN fueron obtenidas por RT-PCR (ver apartado 7.6) a partir de los genomas víricos extraídos por el método de Boom y col. (1990) (ver apartado 7.4).

Las enzimas utilizadas en la reacción de RT-PCR fueron la *Expand RT* (Roche) y la *Pwo DNA polymerase* (Roche). Los cebadores utilizados fueron el A1652 (5'-AATGAAGATCTITGTGGTTTC-3') y el A2614 (5'-AGTCAACCGGTGTGGCGCTG-3'), los cuales contienen dianas para las enzimas de restricción Bgl II y Age I respectivamente (secuencias subrayadas). La amplificación de los ADNc obtenidos mediante retrotranscripción se llevó a cabo siguiendo el programa de PCR detallado a continuación: una desnaturalización inicial de 3 min a 95 °C; 35 ciclos de amplificación desglosados en una desnaturalización de 45 sec a 95 °C, una hibridación de 45 sec a 45 °C y una elongación de 1 min 30 sec a 72 °C; con una elongación final de 7 min a 72 °C. Los tamaños de los amplímeros obtenidos fueron de 968 pb para el genotipo IV - C, 947 pb para el genotipo V - D y 986 pb para el genotipo VI - F (Paso 1, Figura 4.1).

Para sustituir el fragmento de 963 pb del clon de HAsV-1 por los amplímeros de los diferentes genotipos, dicho fragmento fue deleccionado del vector pAVIC6 mediante digestión con las enzimas de restricción Bgl II y Age I (12 h a 37 °C). En su lugar se insertaron, mediante ligación con la ligasa del fago T4 (12 h a 16 °C), los amplímeros de los diferentes genotipos digeridos con las mismas enzimas de restricción (Paso 2, Figura 4.1).

Los diferentes productos de ligación fueron utilizados para transformar células competentes *Library Efficiency E. coli DH5α* (Invitrogen) según procedimientos clásicos (ver apartado 7.10) utilizando como antibiótico de selección la ampicilina a una concentración de 100 µm/ml (Paso 3, Figura 4.1). La correcta disposición del inserto dentro del vector para cada uno de los clones recombinantes (pAVIC6-IV-C, pAVIC6-V-D y pAVIC6-VI-F) fue confirmada por análisis de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción y por análisis de secuencia de ADN (ver apartado 7.8).

Una vez se confirmó que los clonajes eran correctos, el siguiente paso fue obtener genomas víricos a partir de los diferentes clones recombinantes. Para ello, los diferentes clones fueron linearizados con la enzima de restricción Xho I, y 0.5 µg de cada vector linearizado fueron sometidos a transcripción *in vitro* utilizando el *kit T7 Cap Scribe* (Roche) en un volumen final de 20 µl (Paso 4, Figura 4.1).

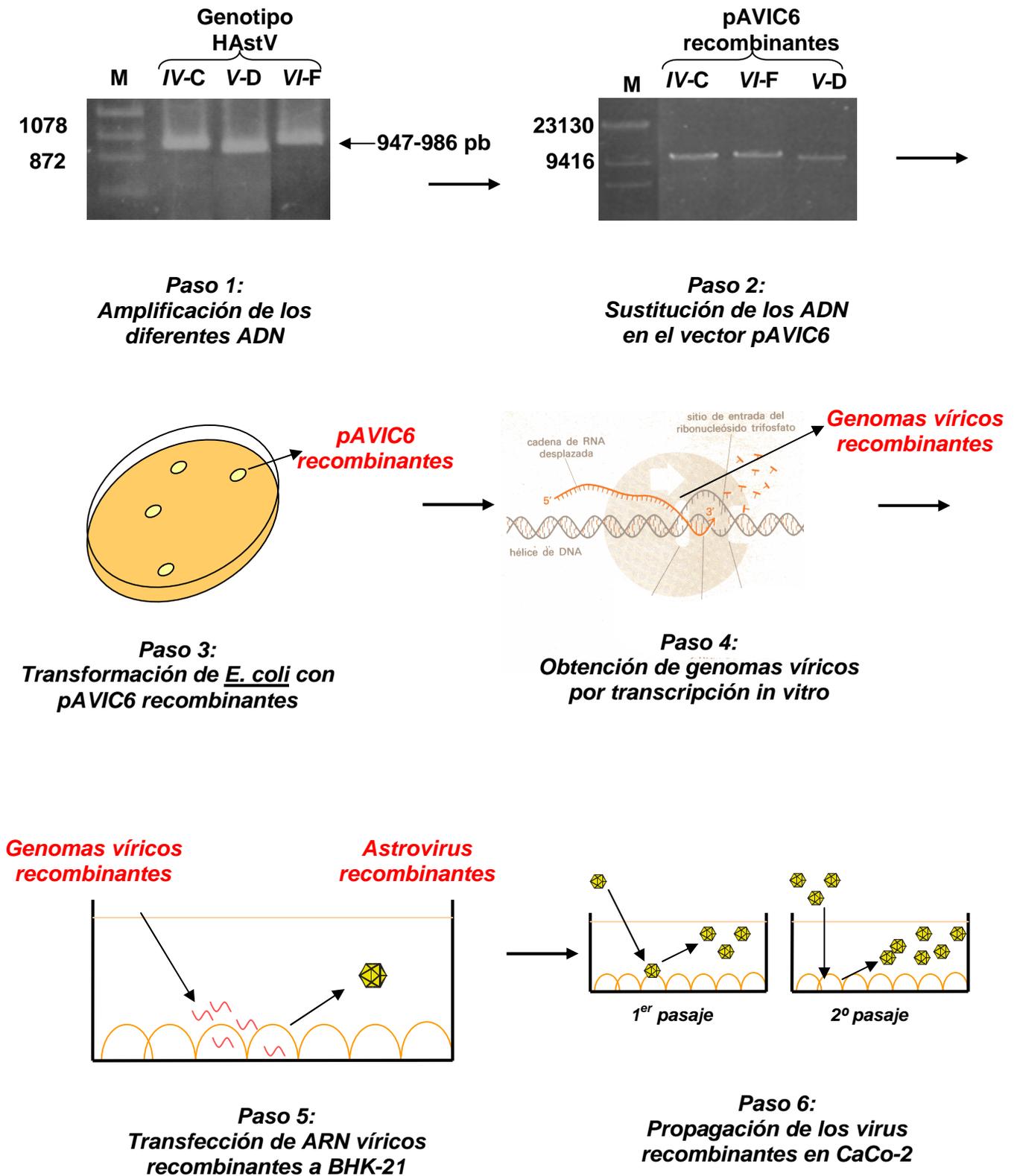


Figura 4.1: Esquema de la obtención de HAstV-1 recombinantes para la región codificante de la proteína nsP1a/4. Pesos moleculares expresados en pares de bases.

Para la obtención de los diferentes astrovirus recombinantes para la proteína nsP1a/4, los productos de transcripción *in vitro* fueron transfectados por electroporación en células BHK-21 utilizando el electroporador *Bio-Rad Gene Pulser* (Bio-Rad).

Brevemente, monocapas de células BHK-21 confluentes en un 80-90% fueron tripsinizadas y las células fueron lavadas con tampón PBS y enfriadas en tampón para electroporación (21 mM HEPES pH 7.05, 137 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.7 mM Na₂HPO₄ y 6 mM Glucosa). A continuación, 2 x 10⁶ células, en un volumen total de 0.8 ml de tampón para electroporación, fueron electroporadas en cubetas de 0.4 cm con una doble descarga a un voltaje de 280 V y una capacitancia de 0.25 mF. Tras la electroporación, las células fueron diluidas en 4 ml de medio de crecimiento con un 10% SFB y sembradas en placas de 35 mm. Tras 6 h de incubación a 37 °C, el medio fue sustituido por medio sin suero (Paso 5, Figura 4.1).

A las 48 post-transfección, las células fueron tratadas con 10 µg/ml tripsina (Sigma GIX) durante 30 min a 37 °C y recogidas junto con el medio de cultivo. Para recuperar los virus del interior celular, las células fueron sometidas a tres ciclos de congelación / descongelación, y el extracto celular fue utilizado para propagar los virus recombinantes recuperados en células CaCo-2 tal y como se detalla en el apartado 7.2.1 (Paso 6, Figura 4.1). La confirmación de la presencia de virus y de su propagación era determinada por inmunofluorescencia (apartado 7.12) utilizando el anticuerpo monoclonal 8E7 específico de astrovirus como anticuerpo primario y un anticuerpo anti-IgG de ratón marcado con cianina (anti-mouse IgG (H+L)-CyTM3, Amersham Pharmacia) como anticuerpo secundario.

La estabilidad de la mutagénesis realizada en la región codificante para la proteína nsP1a/4 en las progenies víricas obtenidas fue confirmada por secuenciación. Para confirmar que los virus sólo se diferenciaban en la región de la mutagénesis, se comprobó si la secuencia de la región del ORF2 del genoma de los virus recombinantes situada entre los nucleótidos 4317 y 4951 (*Acc. N° L23513*) era idéntica a todos los virus y al clon original del pAVIC6. La RT-PCR se realizó con los cebadores For (5'-AAAGAAGTGTGATGGCTAGCA-3') y Mon 245int (5'-CCTGACCAACTAGTAGAAGA-3') y las enzimas *Expand RT* (Roche) y *Pwo DNA polymerase* (Roche) (ver apartado 7.8).

Los virus recombinantes se llamaron HAstV-1//V-C, HAstV-1//V-D y HAstV-1//VI-F. "HAstV-1" porque derivaban del clon pAVIC6 ya que tiene clonado el ADNc del HAstV-1, y "IV-C", "V-D" y "VI-F" en función del genotipo del virus al que pertenecía el fragmento insertado en cada vector de clonación.

El título vírico de las suspensiones de cada virus recombinantes fue determinado por CC-RT-PCR (ver apartado 3.2.3) utilizando para cada virus una pareja de cebadores derivados del A1 y el A2 completamente homólogos a la secuencia del virus (ver Tabla 4.1, pág. 90).

4.2.3. Determinación de la Síntesis de ARN Víricos

Una vez construidos los diferentes virus recombinantes, ya estábamos en disposición de realizar los experimentos para determinar si había diferencias en la capacidad replicativa de astrovirus en función de las propiedades de la proteína nsP1a/4.

En primer lugar se determinó la cantidad de los diferentes ARN víricos sintetizados. Para ello se obtuvieron extractos de membranas celulares de cultivos de células CaCo-2 infectados con los diferentes virus recombinantes para la proteína nsP1a/4. Estos experimentos se realizaron por triplicado, titulando cada experimento un mínimo de dos veces.

Aproximadamente 3×10^6 células fueron infectadas con cada uno de los astrovirus recombinantes a una m.o.i. de 0.01 siguiendo el protocolo detallado en el apartado 6.2.1. A las 48 horas post-infección, las células fueron recuperadas y resuspendidas en tampón TN (50 mM Tris-HCl pH 7.4 y 100 mM NaCl) suplementado con 1% *Nonidet-P40* para romper las células. La suspensión celular se incubó durante 1 h a 4 °C y las membranas celulares se recuperaron por centrifugación durante 5 min a 7.000 g. El precipitado resultante se resuspendió en 50 µl de tampón TN y se utilizó para realizar una extracción de ácidos nucleicos por el método de Boom y col. (1990) y así recuperar los ácidos nucleicos (ver apartado 7.4).

A partir de los ácidos nucleicos purificados se llevó a cabo la titulación los diferentes ARN víricos (ARN genómico de polaridad positiva, ARN anti-genómico de polaridad negativa, y ARN total de polaridad positiva (ARN genómico y ARN subgenómico)). Las titulaciones se realizaron mediante RT-PCR detectando la presencia de los ARN víricos en las diferentes diluciones de la muestra siguiendo una serie dilucional 1/10. Las enzimas utilizadas en las RT-PCR fueron la *Expand RT* (Roche) y la *Expand High Fidelity PCR System* (Roche) (ver apartado 7.6).

La cuantificación de ARN genómicos y ARN anti-genómicos se realizó mediante la amplificación por RT-PCR de una región del ORF1a con los cebadores A1 y A2 (ver apartado 3.2.3). Para la detección del ARN genómico, la reacción de retrotranscripción se

hizo con el cebador A2, mientras que para la detección del ARN anti-genómico se utilizó el cebador A1. La amplificación de los ADNc obtenidos se realizó con ambos cebadores A1 y A2. Los productos de amplificación resultantes variaban de tamaño en función del virus: 192 pb para el HAstV-1/V-D, 213 pb para el HAstV-1/IV-C y 231 pb para el HAstV-1/VI-F).

Para evitar que hubiese diferencias de sensibilidad entre las RT-PCR para los diferentes astrovirus recombinantes debidas a las diferencias de secuencia entre los ARN víricos y los cebadores utilizados para su detección, se diseñaron unas variantes de los cebadores A1 y A2 de modo que para cada virus recombinante, las secuencias de los cebadores eran iguales a las regiones de hibridación en los ARN víricos (Tabla 4.1).

Tabla 4.1: Cebadores utilizados en la cuantificación de ARN genómico y anti-genómico de los diferentes astrovirus recombinantes para la proteína nsP1a/4.

Cebador	Secuencia	Astrovirus recombinantes
Cebador A1	5'-CCTGCCCCGAGAACAACCAAGC-3'	HAstV-1/V-D
Cebador A1C	5'-CCTGCCCCGAGAGCAATCAAGC -3'	HAstV-1/IV-C
Cebador A1F	5'-CCTGCCCCGAGAGCAATCAAAT -3'	HAstV-1/VI-F
Cebador A2	5'-GTAAGATTCCCAGATTGGTGC-3'	HAstV-1/VI-F y V-D
Cebador A2C	5'-GTAAGATTCCCAGATTGGCGC-3'	HAstV-1/IV-C

La cuantificación del ARN vírico total de polaridad positiva (ARN genómico y ARN subgenómico) se realizó mediante la amplificación por RT-PCR de una región del ORF2 con los cebadores Mon244 (5'-GGTGTACAGGACCAAACC-3') y Mon245int (5'-CCTGACCAACTAGTAGAAGA-3') basada en la reacción descrita por Noel y col. (1995). Tras la síntesis del ADNc mediante retrotranscripción con el cebador Mon245int, el programa de PCR constó de una desnaturalización de 3 min a 95 °C; 40 ciclos de amplificación desglosados en una desnaturalización de 30 sec a 94 °C, una hibridación de 30 sec a 50 °C y una elongación de 1 min a 72 °C; y una elongación final de 7 min a 72 °C.

Para todos los virus recombinantes se utilizó el mismo par de cebadores, ya que el genoma de todos ellos era idéntico excepto en la zona del extremo C-terminal del ORF1a donde se había llevado a cabo la mutagénesis del gen de la proteína nsP1a/4. Para todos ellos, el fragmento de amplificación resultante de la RT-PCR presentaba un tamaño de 307 pb.

Finalmente, en todos los casos, los productos de amplificación eran visualizados en geles de poliacrilamida al 9% (ver apartado 7.7). El título de cada ARN vírico se mostró como

unidades de RT-PCR por mililitro expresado en logaritmo en base 10 (\log_{10} uRT-PCR/ml) teniendo en cuenta la última dilución positiva.

4.2.4. Determinación de la Producción de Progenie Vírica Infecciosa

La cuantificación de la progenie vírica infecciosa producida tras la infección de CaCo-2 con los diferentes astrovirus recombinantes para la proteína nsP1a/4 se realizó a partir del medio de cultivo de las células que habían sido infectadas con los diferentes astrovirus recombinantes en los experimentos para la cuantificación de ARN víricos (ver apartado 4.2.3).

Para la cuantificación de las progenies víricas se utilizó el método combinado de infectividad en cultivo celular y detección de ácidos nucleicos por RT-PCR (CC-RT-PCR) descrito en el apartado 3.2.3. Brevemente, diluciones decimales de cada suspensión vírica eran utilizadas como inóculo de infección sobre monocapas de células CaCo-2, y a los 6 días de la infección, los extractos totales de esta infección eran analizados por RT-PCR amplificando la región del extremo C-terminal del ORF1a del genoma del virus con las variantes de los cebadores A1 y A2 descritas en la Tabla 4.1. Los fragmentos de amplificación obtenidos presentaban los mismos tamaños que en el caso de la detección del ARN genómico descritos en el apartado anterior.

Los productos de amplificación eran visualizados en geles de poliacrilamida al 9% (ver apartado 7.7), y la cantidad de virus infecciosos detectados era expresada como unidades de CC-RT-PCR por mililitro en escala logarítmica en base 10 (\log_{10} uCC-RT-PCR/ml) teniendo en cuenta la última dilución positiva.

4.2.5. Programas informáticos para el análisis de las Proteínas nsP1a/4

Con el fin de establecer cuales eran algunas de las principales diferencias bioquímicas entre las proteínas nsP1a/4 de los diferentes astrovirus recombinantes, las secuencias nucleotídicas correspondientes a la zona codificante de la proteína nsP1a/4 y las secuencias aminoacídicas de la propia proteína de los tres virus recombinantes fueron alineadas utilizando el programa informático *CLUSTAL W* (Higgins y col., 1994). En los alineamientos de secuencia nucleotídica, las inserciones y deleciones fueron corregidas manualmente de acuerdo a los alineamientos de las secuencias aminoacídicas de la proteína.

Sobre las secuencias aminoacídicas, se analizaron las posibles modificaciones post-traduccionales. Los lugares de fosforilación fueron predecidos utilizando el programa informático *NetPhos 2.0 Server* con un nivel de significancia de 0.5 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) (Blom y col., 1999). Los lugares de glicosilación de unión de O- β -N-Acetil-Glucosamina (O- β -GlcNAc) y las posiciones *yin-yang*, aquellas que son potencialmente fosforilables y glicosilables, se determinaron utilizando el programa *YinOYang 1.2 Server* (<http://www.cbs.dtu.dk/services/YinOYang/>) (Gupta y Brunak, *manuscrito en preparación*).

4.3. RESULTADOS

4.3.1. Obtención de Astrovirus Recombinantes para la Proteína nsP1a/4

Los genomas víricos obtenidos por transcripción *in vitro* a partir de los diferentes clones pAVIC6 recombinantes para la zona codificante de la proteína nsP1a/4 fueron transfectados al interior de células BHK-21 por electroporación. A las 24 horas no se detectaron virus por inmunofluorescencia para ninguna de las construcciones, lo que indicaba una posible ausencia de virus infecciosos o que el número de virus formados era muy bajo (inferior a 50 virus/ml).

Sin embargo, tras realizar entre 2 y 3 pasajes a ciegas sobre células CaCo-2 partiendo del producto de transfección como inóculo, los títulos víricos se incrementaron sensiblemente. Al realizar una inmunofluorescencia de las monocapas infectadas con el 3^{er} pasaje de los virus, prácticamente todas las células de la monocapa estaban infectadas (Figura 4.2).

El título infeccioso del 3^{er} pasaje de los virus fue determinado por CC-RT-PCR y se situó entre 10^5 y 10^8 uCC-RT-PCR/ml. Cada suspensión vírica se tituló un mínimo de 2 veces y los valores obtenidos se muestran en la Tabla 4.2.

Tabla 4.2: Titulación del 3^{er} pasaje de los diferentes virus recombinantes para la proteína nsP1a/4.

Virus recombinante	1 ^a Titulación	2 ^a Titulación	3 ^a Titulación	Título vírico medio
HAstV-1//V-C	10^7	10^6	10^6	4×10^6
HAstV-1/V-D	10^8	10^7	10^8	7×10^7
HAstV-1/VI-F	10^5	10^5	n.e.	1×10^5

Valores expresados en uCC-RT-PCR/ml. n.e.: no ensayado.

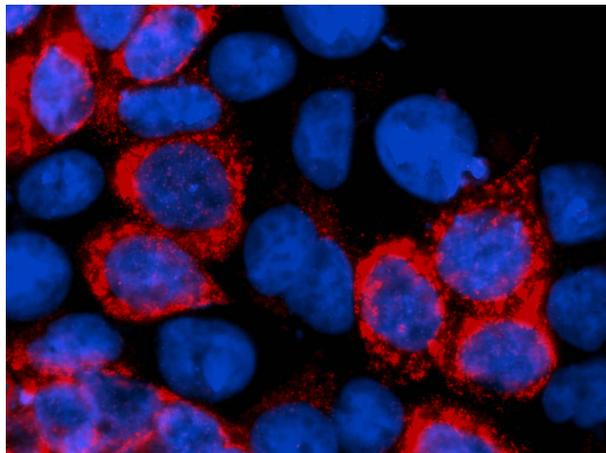


Figura 4.2: Inmunofluorescencia de células CaCo-2 infectadas con el astrovirus recombinante HAstV-1/IV-C. El color anaranjado corresponde a la detección del virus. El color azul corresponde al núcleo teñido con DAPI.

El análisis de secuenciación de ácidos nucleicos realizado sobre los genomas de las tres suspensiones víricas recombinantes confirmaron que la mutagénesis realizada en la zona codificante de la proteína nsP1a/4 era estable y que los diferentes virus sólo se diferenciaban en esa región del genoma ya que la secuencia nucleotídica correspondiente a la región del ORF2 era idéntica entre todos ellos y al vector pAVIC6.

Comparando exclusivamente las secuencias nucleotídicas donde se había realizado la mutagénesis, se observó que el mayor número de diferencias entre los tres genotipos (IV-C, V-D y VI-F) se encontraba en la región 3' del fragmento clonado. Esta región coincide con la anteriormente descrita por otros autores como región hipervariable (HVR) (Willcocks y col., 1994a; Méndez-Toss y col., 2000; Oh y Schreier, 2001; y Guix y col., 2002). En esta región se observó la presencia de numerosas inserciones y deleciones siempre múltiples de tres nucleótidos lo que es una evidencia inequívoca de que se trata de una región codificante (Figura 4.3).

Fuera de la zona de mutagénesis, las secuencias de los genomas de los tres clones eran idénticas entre ellas y al vector pAVIC6 (Figura 4.4).

pAVI C6	AAAGAAGTGTGATGGCTAGCAAGTCCAATAAGCAGGTAAGTCTTGGAGGTCAGTAATAATG	60
HAsV-1//V-C	AAAGAAGTGTGATGGCTAGCAAGTCCAATAAGCAGGTAAGTCTTGGAGGTCAGTAATAATG	60
HAsV-1//V-F	AAAGAAGTGTGATGGCTAGCAAGTCCAATAAGCAGGTAAGTCTTGGAGGTCAGTAATAATG	60
HAsV-1//V-D	AAAGAAGTGTGATGGCTAGCAAGTCCAATAAGCAGGTAAGTCTTGGAGGTCAGTAATAATG	60

pAVI C6	GCCGCAACAGGAGTAAATCAAGGGCCCGTTCACAATCTAGGGGCCGAGATAAATCAGTCA	120
HAsV-1//V-C	GCCGCAACAGGAGTAAATCAAGGGCCCGTTCACAATCTAGGGGCCGAGATAAATCAGTCA	120
HAsV-1//V-F	GCCGCAACAGGAGTAAATCAAGGGCCCGTTCACAATCTAGGGGCCGAGATAAATCAGTCA	120
HAsV-1//V-D	GCCGCAACAGGAGTAAATCAAGGGCCCGTTCACAATCTAGGGGCCGAGATAAATCAGTCA	120

pAVI C6	AGATTACAGTCAATTCAGAAACAGAGCCAGGAGACAGCCGGACGCGACAACCGTCAAT	180
HAsV-1//V-C	AGATTACAGTCAATTCAGAAACAGAGCCAGGAGACAGCCGGACGCGACAACCGTCAAT	180
HAsV-1//V-F	AGATTACAGTCAATTCAGAAACAGAGCCAGGAGACAGCCGGACGCGACAACCGTCAAT	180
HAsV-1//V-D	AGATTACAGTCAATTCAGAAACAGAGCCAGGAGACAGCCGGACGCGACAACCGTCAAT	180

pAVI C6	CTTCTCAACGTGTCCGTAACATTGTCAATAAGCAACTCAGGAAACAGGGTGTACAGGAC	240
HAsV-1//V-C	CTTCTCAACGTGTCCGTAACATTGTCAATAAGCAACTCAGGAAACAGGGTGTACAGGAC	240
HAsV-1//V-F	CTTCTCAACGTGTCCGTAACATTGTCAATAAGCAACTCAGGAAACAGGGTGTACAGGAC	240
HAsV-1//V-D	CTTCTCAACGTGTCCGTAACATTGTCAATAAGCAACTCAGGAAACAGGGTGTACAGGAC	240

pAVI C6	CAAAACCTGCAATATGTGAGAGAGCAACAGCAACCCTTGGGACGGTCCGGTCAAACACCA	300
HAsV-1//V-C	CAAAACCTGCAATATGTGAGAGAGCAACAGCAACCCTTGGGACGGTCCGGTCAAACACCA	300
HAsV-1//V-F	CAAAACCTGCAATATGTGAGAGAGCAACAGCAACCCTTGGGACGGTCCGGTCAAACACCA	300
HAsV-1//V-D	CAAAACCTGCAATATGTGAGAGAGCAACAGCAACCCTTGGGACGGTCCGGTCAAACACCA	300

pAVI C6	GTGGCACCACTGAGATTGAGGCGTGTATTCTCCTCAACCCTGTCCTCGTTAAGGACGCTA	360
HAsV-1//V-C	GTGGCACCACTGAGATTGAGGCGTGTATTCTCCTCAACCCTGTCCTCGTTAAGGACGCTA	360
HAsV-1//V-F	GTGGCACCACTGAGATTGAGGCGTGTATTCTCCTCAACCCTGTCCTCGTTAAGGACGCTA	360
HAsV-1//V-D	GTGGCACCACTGAGATTGAGGCGTGTATTCTCCTCAACCCTGTCCTCGTTAAGGACGCTA	360

pAVI C6	CTGGAAGCACTCAGTTTGGCCCTGTGCAGGCGCTAGGTGCACAGTATTCATGTGGAAGC	420
HAsV-1//V-C	CTGGAAGCACTCAGTTTGGCCCTGTGCAGGCGCTAGGTGCACAGTATTCATGTGGAAGC	420
HAsV-1//V-F	CTGGAAGCACTCAGTTTGGCCCTGTGCAGGCGCTAGGTGCACAGTATTCATGTGGAAGC	420
HAsV-1//V-D	CTGGAAGCACTCAGTTTGGCCCTGTGCAGGCGCTAGGTGCACAGTATTCATGTGGAAGC	420

pAVI C6	TGAAGCTGAAGTATTTGAATGTCAAATTAACCTCTATGGTTGGTGCATCTGCTGTTAATG	480
HAsV-1//V-C	TGAAGCTGAAGTATTTGAATGTCAAATTAACCTCTATGGTTGGTGCATCTGCTGTTAATG	480
HAsV-1//V-F	TGAAGCTGAAGTATTTGAATGTCAAATTAACCTCTATGGTTGGTGCATCTGCTGTTAATG	480
HAsV-1//V-D	TGAAGCTGAAGTATTTGAATGTCAAATTAACCTCTATGGTTGGTGCATCTGCTGTTAATG	480

pAVI C6	GTACTGTCTCAGGGTCTCACTTAACCCACATCTACGCCATCTTCTACTAGTTGGTCAG	540
HAsV-1//V-C	GTACTGTCTCAGGGTCTCACTTAACCCACATCTACGCCATCTTCTACTAGTTGGTCAG	540
HAsV-1//V-F	GTACTGTCTCAGGGTCTCACTTAACCCACATCTACGCCATCTTCTACTAGTTGGTCAG	540
HAsV-1//V-D	GTACTGTCTCAGGGTCTCACTTAACCCACATCTACGCCATCTTCTACTAGTTGGTCAG	540

pAVI C6	G 541	
HAsV-1//V-C	G 541	
HAsV-1//V-F	G 541	
HAsV-1//V-D	G 541	
	*	

Figura 4.4: Alineamiento de las secuencias nucleotídicas del extremo 5' del ORF2 de los tres virus recombinantes y del vector pAVIC6; donde (-): deleción de nucleótido. (*): nucleótido igual en todos los virus y el plásmido. En azul se marca la región de hibridación del cebador Mon244 y en rojo la del cebador Mon245int.

4.3.2. Comparación de la Síntesis de ARN Víricos

Una vez obtenidos los diferentes astrovirus recombinantes para la proteína nsP1a/4, se llevaron a cabo los experimentos para comparar la capacidad de síntesis de ARN víricos y de replicación entre los diferentes virus recombinantes.

Por lo que hace referencia a los experimentos de cuantificación de la síntesis de los diferentes ARN víricos, se realizaron tres experimentos independientes, y en cada uno de los experimentos se tituló cada muestra un mínimo de dos veces a partir de bancos de diluciones independientes. Los resultados de la cuantificación se muestran en la Tabla 4.3 como unidades de RT-PCR por mililitro expresados en logaritmo en base 10.

Tabla 4.3: Titulación de los diferentes ARN víricos para los diferentes clones de astrovirus.

Virus recombinante	ARN Total de polaridad positiva	ARN genómico	ARN anti-genómico
HAstV-1/IV-C	7.87 ± 0.98	5.97 ± 0.52	5.80 ± 0.55
HAstV-1/V-D	7.87 ± 1.27	6.30 ± 0.89	5.30 ± 0.58
HAstV-1/VI-F	7.13 ± 0.75	7.47 ± 0.75	6.80 ± 0.84

Valores de los tres experimentos expresados en \log_{10} uRT-PCR/ml como media ± desviación estándar.

A primera vista se observó que la cantidad de ARN genómico y ARN anti-genómico sintetizada por el virus recombinante HAstV-1/VI-F era claramente superior a la sintetizada por los otros dos virus recombinantes. Sin embargo, estas diferencias desaparecían cuando se comparaba la cantidad de ARN total de polaridad positiva (ARN genómico y ARN subgenómico).

Al realizar el estudio del análisis de la varianza (ANOVA) aplicando el test LSD con una probabilidad de error del 0.05 ($p\text{-value} < 0.05$), se confirmaron de forma estadística las diferencias entre los títulos de ARN genómico y ARN antigenómico del recombinante HAstV-1/VI-F respecto a los de los virus recombinantes HAstV-1/IV-C y HAstV-1/V-D. La cantidad de ARN total de polaridad positiva no mostraba diferencias significativas entre los diferentes virus recombinantes (Figura 4.5).

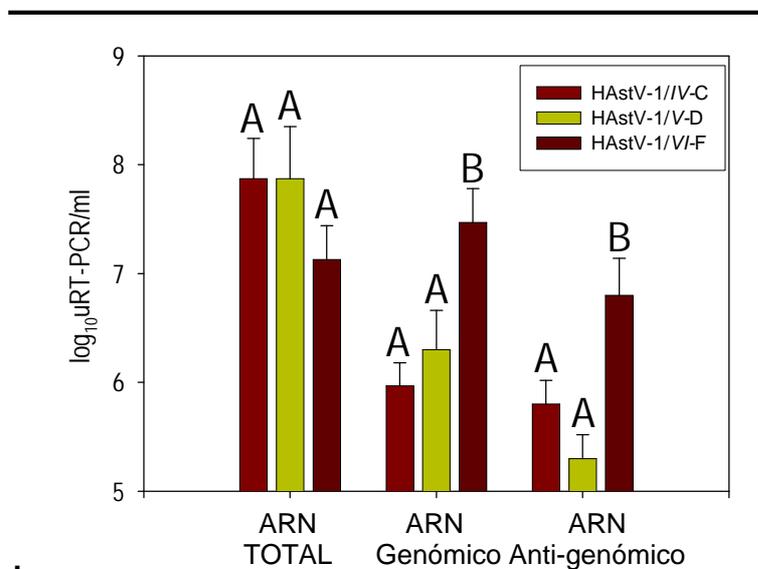


Figura 4.5: ANOVA de la titulación de los diferentes ARN víricos para los diferentes virus recombinantes. Valores expresados como media \pm error estándar. Las letras sobre las barras indican los grupos homogéneos.

Cuando los valores obtenidos para la cuantificación de ARN total de polaridad positiva eran desglosados en tanto por ciento de ARN genómico y ARN subgenómico respecto al ARN total, se observaron importantes diferencias que podían sugerir patrones distintos de replicación vírica entre los diferentes genotipos de astrovirus. La cantidad de ARN subgenómico se estimó realizando la sustracción del ARN genómico al ARN total (Tabla 4.4).

Tabla 4.4: Porcentajes de ARN genómico y ARN subgenómico respecto al ARN total de polaridad +.

Virus recombinantes	ARN total de polaridad positiva	% ARN genómico	% ARN subgenómico
HAstV-1/IV-C	7.87 \pm 0.98	1.82 \pm 1.92	98.18 \pm 1.92
HAstV-1/V-D	7.87 \pm 1.27	20.75 \pm 15.20	79.25 \pm 15.20
HAstV-1/VI-F	7.13 \pm 0.75	> 99.99 *	< 0.01 *

*: Diferencias estadísticamente significativas respecto al resto de genotipos (p -value < 0.05).

Analizando estos porcentajes se observó que la cantidad de ARN subgenómico producido por los virus recombinantes HAstV-1/IV-C y HAstV-1/V-D era muy superior al producido por el HAstV-1/VI-F siendo la proporción del ARN subgenómico de este último muy baja respecto al ARN total de polaridad positiva. Al realizar una ANOVA aplicando el test LSD con una probabilidad de error del 0.05, se observó que las diferencias observadas eran estadísticamente significativas (p -value < 0.05) (Tabla 4.4).

4.3.3. Comparación de la Producción de Progenie Vírica Infecciosa

Los experimentos de cuantificación de producción de progenie vírica infecciosa se llevaron a cabo a partir de los medios de cultivos infectados en los experimentos realizados para la cuantificación de síntesis de ARN víricos. En cada uno de los experimentos se tituló cada muestra un mínimo de dos veces a partir de bancos de diluciones independientes. Los resultados de la cuantificación se muestran en la Tabla 4.5 como unidades de CC-RT-PCR por mililitro expresados en logaritmo en base 10.

Tabla 4.5: Titulación de las progenies víricas obtenidas tras infección de CaCo-2 con los tres virus recombinantes

Virus recombinante	Progenie vírica media
HAstV-1/IV-C	7.75 ± 0.50
HAstV-1/V-D	8.25 ± 0.50
HAstV-1/VI-F	7.00 ± 0.00

Valores expresados en \log_{10} uCC-RT-PCR/ml como media \pm desviación estándar

El estudio del análisis de la varianza (ANOVA), aplicando el test LSD con una probabilidad de error del 0.05, confirmó estadísticamente las diferencias entre las progenies víricas producidas por los recombinantes HAstV-1/IV-C y HAstV-1/V-D respecto a la producida por el HAstV-1/VI-F, siendo la de este último inferior a la de los dos primeros (p -value < 0.05) (Figura 4.6).

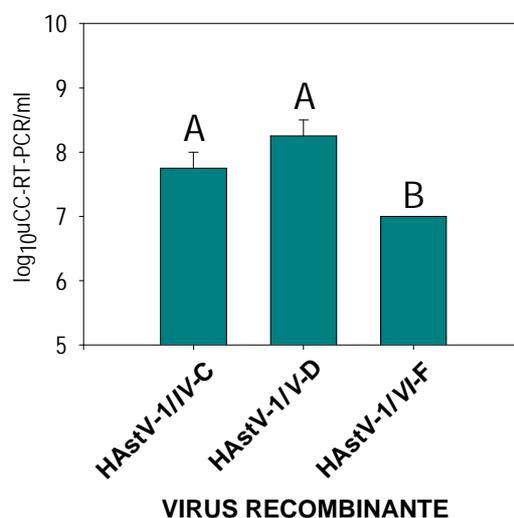


Figura 4.6: ANOVA de la titulación de las progenies víricas de los tres virus recombinantes. Valores expresados como media \pm error estándar. Las letras sobre las barras indican los grupos homogéneos.

propiedades biológicas de la proteína nsP1a/4 y con los cambios existentes en esta proteína entre los diferentes genotipos del virus.

Con el fin de intentar esclarecer qué propiedades biológicas de la proteína nsP1a/4 podían estar relacionadas con una función de regulación de la replicación del ARN vírico, se estudió la presencia de residuos aminoacídicos susceptibles a modificaciones post-traduccionales con varios programas informáticos de predicción que indicaban qué residuos Ser, Thr y Tyr podían ser fosforilables, glicosilables o ambas cosas.

Los patrones de fosforilación y glicosilación de la proteína nsP1a/4 eran muy similares entre los diferentes clones a lo largo de toda la secuencia aminoacídica analizada a excepción de la región hipervariable rica en inserciones y deleciones.

Con respecto al patrón de fosforilación, la proteína nsP1a/4 del clon HAstV-1/VI-F presentaba una mayor proporción de residuos fosforilables, un total de 24, que los otros dos clones, que tenían 20 cada uno. Al analizar qué tipo de residuos eran fosforilables, se observó que los tres clones tenían aproximadamente el mismo número de tirosinas fosforilables, entre 10 y 11, y que las principales diferencias venían en el número de serinas y treoninas fosforilables, 10 para los clones HAstV-1/IV-C y HAstV-1/V-D y 14 para el clon HAstV-1/VI-F. Concretamente en la región hipervariable era donde se observaban la mayoría de diferencias entre los distintos clones con 7 residuos Ser o Thr fosforilables en el HAstV-1/VI-F y con 4 y 3 residuos Ser o Thr fosforilables en los clones HAstV-1/V-D y IV-C respectivamente (Figuras 4.7 y 4.8).

En cuanto al patrón de glicosilación, las diferencias entre los tres clones no eran tan evidentes ni teniendo en cuenta toda la secuencia de la proteína ni centrándonos en la región hipervariable. En total, el clon HAstV-1/IV-C tenía 11 residuos Ser o Thr glicosilables y los clones HAstV-1/V-D y HAstV-1/VI-F tenía 14 cada uno. Específicamente en la región hipervariable, el clon HAstV-1/IV-C tenía 4 residuos Ser o Thr glicosilables y los clones HAstV-1/V-D y HAstV-1/VI-F tenía 6 cada uno (Figuras 4.7 y 4.9).

Finalmente, en cuanto a las posiciones *yin-yang*, aquellas que pueden ser tanto fosforiladas como glicosiladas, los resultados seguían la tendencia marcada por los lugares fosforilables encontrado 7 posiciones *yin-yang* en el clon HAstV-1/VI-F, 5 en el clon HAstV-1/V-D y 4 en el clon HAstV-1/IV-C, encontrándose las diferencias dentro de la región hipervariable (Figuras 4.7 y 4.9).

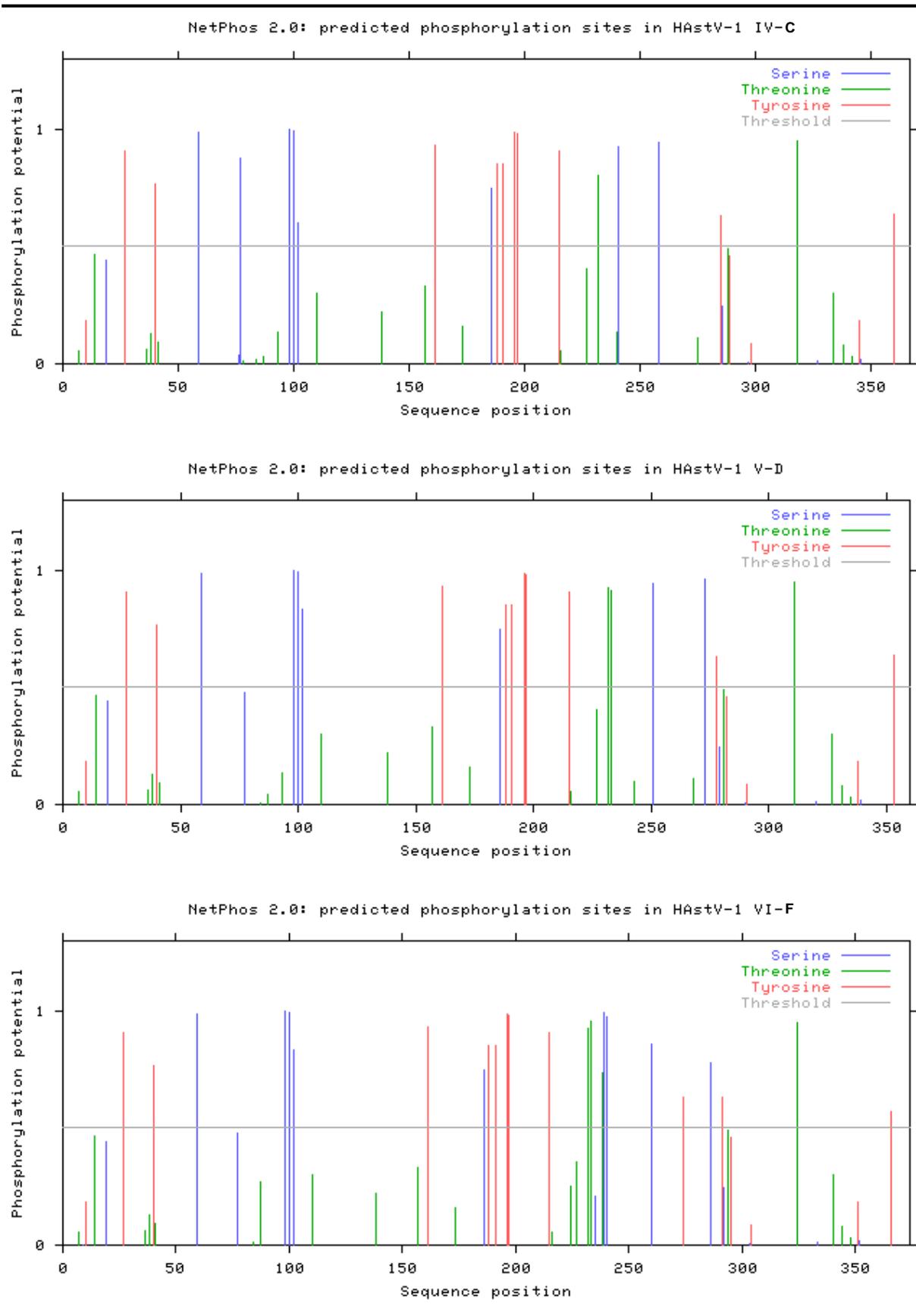


Figura 4.8: Patrón de fosforilación de las secuencias aminoacídicas de la región de la proteína nsP1a/4 para cada uno de los virus recombinantes según el programa NetPhos 2.0 con un nivel de significancia de 0.5.

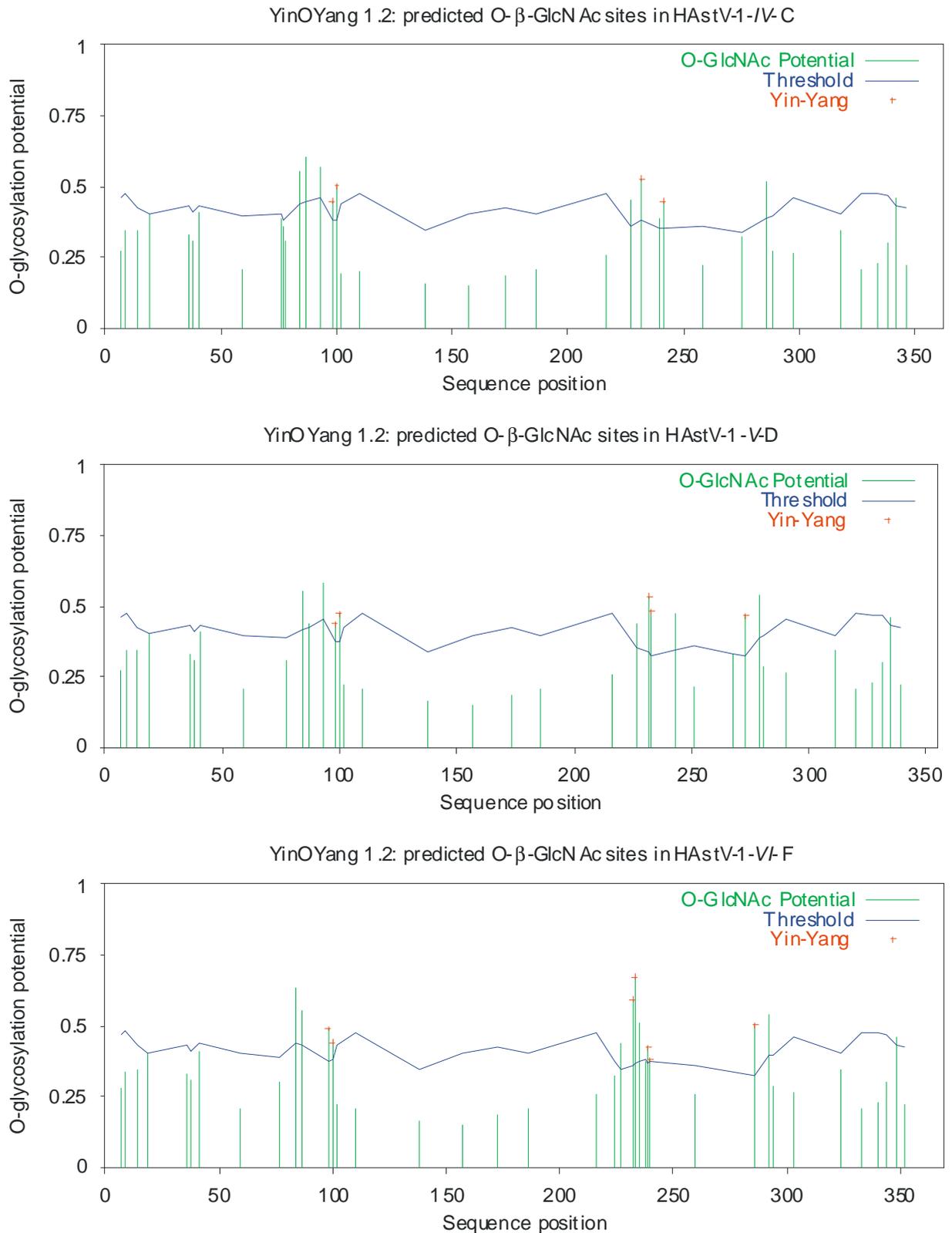


Figura 4.9: Patrón de glicosilación de las secuencias aminoácidas de la región de la proteína nsP1a/4 para cada uno de los virus recombinantes según el programa YinOYang 1.2 con un nivel de significancia de 0.5. También se muestran los residuos *yin-yang*.

4.4. DISCUSIÓN

La construcción de tres clones de astrovirus genéticamente idénticos a excepción de la zona codificante para la proteína nsP1a/4 del ORF1a ha permitido establecer una relación directa entre la proteína nsP1a/4 de astrovirus y la replicación del genoma vírico.

Cada virus recombinante se caracterizaba por tener clonada la secuencia que codifica para la proteína nsP1a/4 correspondiente a diferentes genotipos de astrovirus, en concreto, para los genotipos IV-C, V-D y VI-F (Guix y col., *manuscrito en preparación*). Las diferencias encontradas entre los distintos clones con respecto a la síntesis de ARN víricos y a los niveles de producción de progenie vírica indican un papel importante de la proteína nsP1a/4 en la replicación de astrovirus ya que dichas diferencias sólo pueden ser atribuidas a la variabilidad existente entre las proteínas nsP1a/4 de los diferentes clones.

Recientemente, Guix y col. (2004b) han sugerido que la proteína nsP1a/4 está relacionada con la replicación del genoma vírico. El análisis de la secuencia aminoacídica de esta proteína permitió comprobar la existencia de similitudes con otras proteínas no estructurales de otros virus, también relacionadas con la replicación del ARN vírico, como la nsP3 de alphavirus. Se identificaron una serie de propiedades generalmente asociadas con la replicación del ARN vírico como la presencia de una región rica en prolina y glutaminas, de varios residuos potencialmente fosforilables o glicosilables y de una señal de retención en membranas de retículo endoplasmático.

Además de todo este análisis computacional, también observaron una colocalización de la proteína nsP1a/4 con el ARN vírico y el propio retículo endoplasmático. Sin embargo, a

pesar de todas estas aproximaciones, no se descartó que este papel modulador de la replicación del ARN vírico pudiese ser llevado a cabo por otras proteínas del virus.

El modelo propuesto de replicación de astrovirus comienza con la entrada del virus al interior de la célula donde el genoma vírico se desencapsida y se copia para dar un ARN anti-genómico de polaridad negativa. Este ARN anti-genómico sirve de molde a la ARN polimerasa vírica para sintetizar nuevos ARN genómicos y ARN subgenómicos. Los ARN subgenómicos se utilizan para producir las proteínas estructurales de la cápside que permitirán encapsidar los ARN genómicos y liberar la progenie vírica al exterior celular cerrando el ciclo (Monroe y col., 1991; Monroe y col. 1993; Lewis y col., 1994; y Matsui y Greenberg, 2001a).

En este trabajo no se detectaron diferencias entre los tres clones con respecto a la síntesis de ARN total vírico de polaridad positiva, pero sí se observó que el clon HAstV-1//VI-F sintetizaba más ARN genómico y ARN anti-genómico que los clones HAstV-1//IV-C y HAstV-1//V-D (ver Tabla 4.3 y Figura 4.5).

Estos resultados sugerían que el clon HAstV-1//VI-F podría tener una mayor capacidad replicativa que los otros dos (HAstV-1//IV-C y HAstV-1//V-D). Sin embargo, cuando este ARN anti-genómico era utilizado como molde para dar lugar a los nuevos ARN genómicos y ARN subgenómicos, se observó que el clon HAstV-1//VI-F era muy poco eficiente sintetizando ARN subgenómico y que prácticamente todo el ARN de polaridad positiva correspondía a ARN genómico. Por el contrario, para los clones HAstV-1//IV-C y HAstV-1//V-D, esta relación se invertía, y la cantidad de ARN subgenómicos superaba ampliamente a la de ARN genómicos (ver Tabla 4.4).

De este modo, y siguiendo el modelo de replicación de astrovirus, en el caso del HAstV-1//VI-F existiría un déficit de ARN subgenómico que comprometería la síntesis de proteínas estructurales en grandes cantidades, y por muchos ARN genómicos que hubiera, todos no podrían ser encapsidados dando lugar a virus infecciosos, con lo que el título vírico de la progenie sería bajo. Por el contrario, los clones HAstV-1//IV-C y HAstV-1//V-D, al tener mayor proporción de ARN subgenómicos, podrían sintetizar grandes cantidades de proteína estructural de la cápside y tendrían la capacidad de encapsidar la mayoría de los ARN genómicos sintetizados dando lugar a progenies víricas de mayor título.

Si bien se necesitan más estudios para confirmar esta hipótesis referente a la existencia de diferentes estrategias en la modulación de la replicación del ARN vírico en función del

genotipo de astrovirus, ésta se ve reforzada por los resultados obtenidos en la cuantificación de virus presentes en las progenies víricas de infecciones *in vitro* (ver Tabla 4.5 y Figura 4.6) y en las heces de pacientes con gastroenteritis causadas por astrovirus (ver Estudio I). En el presente estudio, los clones equivalentes a los genotipos IV-C y V-D presentaban mayores progenies víricas infecciosas que el genotipo VI-F, y en las muestras fecales, las cargas virales excretadas para los genotipos IV-C y V-D eran superiores a las de cualquier otro genotipo.

La replicación del genoma vírico es un proceso complejo que implica un gran número de interacciones entre los ARN víricos y diferentes proteínas tanto de origen vírico como celular. En consecuencia, no se puede condicionar su funcionamiento a las características biológicas de una única proteína, pero cambios en cualquiera de los engranajes de la maquinaria del proceso pueden dar lugar a ventajas o desventajas en su funcionamiento general.

La proteína nsP3 de alphavirus presenta una región amino-terminal muy conservada mientras que la región carboxi-terminal presenta una elevada variabilidad incluyendo inserciones y deleciones (Strauss y col., 1988; y LaStarza y col., 1994a). Su función exacta no se conoce pero se ha descrito que es imprescindible para la síntesis de ARN víricos (Hahn y col., 1989; y LaStarza y col., 1994b). Se trata de una proteína que se modifica post-traduccionalmente por fosforilación de residuos Ser y Thr en una proporción 2:1 dando lugar a varias formas con diferente movilidad electroforética (Peränen y col., 1988; y Li y col., 1990). También se ha descrito que es capaz de unirse a membranas celulares (LaStarza y col., 1994b). Cuando todas estas características de la proteína nsP3 de alphavirus son comparadas con las descritas por Guix y col. (2004b), y teniendo en cuenta que el modelo de replicación de astrovirus se extrapola de los bien conocidos modelos del virus Sindbis y del virus Semliki Forest, dos alphavirus, es lícito hipotetizar sobre paralelismos funcionales entre ambas proteínas, y más con los resultados obtenidos en este estudio que confirman la relación de la proteína nsP1a/4 con la replicación del genoma de astrovirus.

Si bien habíamos demostrado dicha relación, era necesario estudiar más a fondo qué propiedades de la proteína nsP1a/4 permitía que hubiese diferencias en las estrategias de replicación de los diferentes clones, o lo que es equivalente de los diferentes genotipos de astrovirus, de modo que se tradujese en una mayor capacidad para producir progenie vírica. Para ello realizamos un análisis computacional de los potenciales lugares de modificación post-traduccionales por fosforilación y/o glicosilación que presentaban la proteína nsP1a/4 correspondientes a los diferentes genotipos.

En el caso de los alphavirus parece existir una regulación de la función de la proteína nsP3 en relación con sus niveles de fosforilación ya que mutaciones que deleccionan residuos potencialmente fosforilables hacen que se reduzca la síntesis de ARN víricos (Li y col., 1990; y Vihinen y col., 2001).

En nuestro caso, la proteína nsP1a/4 de astrovirus presenta una serie de inserciones y deleciones en la región hipervariable entre los diferentes genotipos del virus que provoca la aparición o desaparición de nuevos lugares de fosforilación en residuos Ser y Thr. De este modo, el clon correspondiente al genotipo HAstV//VI-F presenta 7 residuos Ser y Thr fosforilables en la región hipervariable frente a los 4 y 3 que presentan los genotipos HAstV//V-D y HAstV//IV-C respectivamente. Según el modelo de alphavirus, estas diferencias se corresponderían con una mayor capacidad de síntesis de ARN víricos por parte del clon HAstV//VI-F. Cuando analizamos nuestros resultados, se confirmó que éste clon sintetizaba, de forma significativa, más cantidad de ARN genómico y ARN anti-genómico que los otros dos clones. En consecuencia, los resultados obtenidos sugieren que los niveles de ARN genómicos y anti-genómicos están relacionados con los niveles de fosforilación de la proteína nsP1a/4 de modo que cuanto más fosforilada está, más ARN se sintetiza. La misma tendencia en cuanto a diferencias se observa con respecto a los potenciales lugares de glicosilación, pero las diferencias entre los tres clones no son tan evidentes y el papel de la glicosilación en la regulación de la síntesis de ARN víricos no está tan claro.

Comentario aparte merece la síntesis del ARN subgenómico. LaStarza y col. (1994b) describieron el caso de un mutante del virus Sindbis que presentaba una inserción de tres aminoácidos en la proteína nsP3 y esto producía que, a pesar de que sintetizaba las cantidades de ARN genómico y ARN anti-genómico correctas, era defectivo en la síntesis de ARN subgenómico. Sin cerrar las puertas a otras posibles explicaciones, LaStarza y col. relacionaron la baja síntesis de ARN subgenómico por una alteración en el patrón de fosforilación de la proteína nsP3 de modo que la conformación de la proteína quedaba modificaba y se dificultaba su interacción con el promotor situado en el ARN anti-genómico que permitía la síntesis del ARN subgenómico pero no con el promotor que daba lugar al ARN genómico.

Curiosamente, nuestros resultados muestran que el genotipo HAstV//VI-F presenta una inserción de 5 aminoácidos (de la A₂₆₄ a la P₂₆₈) que no presentan los otros dos genotipos estudiados y que podría explicar, al igual que en el caso anterior de alphavirus, una menor eficiencia en la síntesis de ARN subgenómicos sin verse afectados los niveles de ARN genómicos y ARN anti-genómicos.

Finalmente, si bien todas estas comparaciones entre los resultados obtenidos en este estudio y los modelos de replicación del ARN vírico de alphavirus hacen que nuestra hipótesis inicial referente a la existencia de diferentes estrategias de replicación del genoma de astrovirus en función del genotipo del virus se vea reforzada, para confirmar el papel de la fosforilación en la regulación de la proteína nsP1a/4 se necesitarían futuros estudios de mutagénesis puntual en los residuos potenciales de ser fosforilados y la evaluación del efecto de estas mutaciones sobre la replicación del ARN vírico.

5. ESTUDIO III:

**ENSAMBLAJE DE PARTÍCULAS *VIRUS-LIKE* (VLPs) DE
ASTROVIRUS COMO MODELO DE LA MORFOGÉNESIS VIRAL**

5.1. ANTECEDENTES

A pesar de que hace más de 25 años que se descubrieron los astrovirus, todavía no existe un modelo único universalmente aceptado que explique como tiene lugar la morfogénesis del virus ni como se generan las diferentes proteínas que forman parte de la cápside.

Tradicionalmente, a los astrovirus se les ha atribuido un diámetro de unos 28 nm, con una superficie lisa y una característica estrella de cinco o seis puntas en la superficie del 10% de las partículas (Madeley y Cosgrove, 1975). A medida que se han ido realizando nuevos estudios, se ha observado que el diámetro de las partículas víricas puede variar, en función de la fuente del virus y el método de preparación para la observación al microscopio electrónico, entre 28 y 43 nm (Woode y col., 1984; Aroonpraset y col., 1989; Risco y col., 1995; y Matsui y Greenberg, 2001a). Cabe destacar que también se ha descrito la presencia de espículas protuberantes en la superficie de los viriones en contra de los primeros estudios que describían virus de superficie lisa (Risco y col., 1995; y Matsui y Greenberg, 2001a).

Está demostrado que las proteínas de la cápside del virus se generan a partir de un ARN subgenómico producido a partir del ORF2 del genoma del virus (Monroe y col., 1993). El ORF2 del HAstV-1 codifica para una poliproteína de 787 aminoácidos con un peso molecular teórico de 87 kDa (Monroe y col., 1991; y Lewis y col., 1994). Esta poliproteína de 87kDa es el precursor de las proteínas de menor tamaño que forman parte del virión maduro: 32-35 kDa, 27-31 kDa y 24-26 kDa (Monroe y col., 1991; Lewis y col., 1994; Belliot y col., 1997a; y Bass y Qiu, 2000).

Hoy en día, el procesamiento proteolítico del precursor hacia las diferentes proteínas estructurales que forman parte del virión es aún objeto de controversia, y hasta la fecha se han propuesto tres modelos diferentes (ver Figura 1.4, página 17).

En un principio, Bass y Qiu (2000) propusieron un procesamiento intracelular del precursor de la cápside del HAsV-1 por su extremo amino-terminal entre los residuos 70 (Arg) y 71 (Lys) dando lugar a una poliproteína de aproximadamente 79 kDa. Esta nueva poliproteína se ensamblaría formando un virión inmaduro que tras salir al exterior celular sería procesado por la acción de la tripsina dando lugar al virión maduro infeccioso con las proteínas estructurales de menor tamaño.

Posteriormente, Geingenmüller y col. (2002b) refutaron este modelo y propusieron que era directamente la poliproteína de 87 kDa la que se ensamblaba dando lugar al virión inmaduro. Finalmente, Méndez y col. (2002) propusieron un tercer modelo en el que el precursor de la cápside del HAsV-8 era procesado intracelularmente por el extremo carboxi-terminal generándose una nueva poliproteína de 70 kDa que se ensamblaría dando lugar al virión inmaduro.

La formación de partículas “virus-like” (VLPs) a partir de la expresión de los genes codificantes para las proteínas de la cápside se ha logrado en diferentes sistemas de expresión heteróloga para un gran número de virus ARN como calicivirus, rotavirus y hepatitis A (French y Roy, 1990; Jiang y col., 1992; Crawford y col., 1994; y Pintó y col., 2003), e incluso para el HAsV-2 bajo el sistema de expresión de Vaccinia (Dalton y col., 2003). Debido a las grandes cantidades de material vírico que se obtiene en los diferentes sistemas de expresión, las VLPs han sido utilizadas como herramientas para el análisis de morfogénesis viral (Kosukegawa y col., 1996; y White y col., 1997) y para estudios de inmunización (Conner y col., 1996). Además las VLPs han sido propuestas para su futuro uso en terapia génica (El Mehdaoui y col., 2000; y Touzé y col., 2001) y como portadores de epítomos y moléculas trazadoras (Nagesha y col., 1999; y Charpilienne y col., 2001).

El objetivo del último estudio de esta tesis doctoral fue poner a punto una metodología de producción de VLPs de astrovirus con el sistema de expresión heteróloga de baculovirus recombinantes a partir de la expresión del ORF2 de astrovirus que nos permitiese obtener datos experimentales para discutir cual de los modelos de ensamblaje propuestos hasta el momento era el correcto, y al mismo tiempo que nos permitiese estudiar la morfogénesis de astrovirus.

Para conseguir este objetivo, nos centramos en los modelos de ensamblaje de partículas víricas de HAstV-1 propuestos por Bass y Qiu (2000) y Geigenmüller y col. (2002b). El modelo propuesto por Méndez y col. (2002) no lo tuvimos en cuenta al basar sus estudios en el serotipo 8 de astrovirus.

De este modo, la estrategia a seguir fue construir baculovirus recombinantes que expresasen la poliproteína completa de 87 kDa (modelo de Geigenmüller y col., 2002b) y la poliproteína procesada de 79 kDa (modelo de Bass y Qiu, 2000).

Tras analizar los productos de expresión obtenidos, se estudió el efecto de diferentes condiciones químicas en la purificación de las VLPs como puede ser la utilización de gradientes de sacarosa o CsCl en la purificación, y la presencia o ausencia de agentes quelantes de iones divalentes en la purificación, para finalmente caracterizar biológicamente las VLPs obtenidas.

Además, también se construyó un baculovirus recombinante que expresase una proteína de fusión entre la GFP y la poliproteína de 79 kDa según el modelo de Bass de forma que si se formasen VLPs fluorescentes se abriera la puerta a su posible utilización como virus trazadores en estudios ambientales tal y como se realizó en su día con GFPVLPs de rotavirus (Caballero y col., 2004).

5.2. MATERIALES Y MÉTODOS

5.2.1. Virus y Líneas Celulares

A lo largo de este estudio se utilizó la línea celular Sf9 (*Spodoptera frugiperda*) para la propagación de las diferentes cepas de baculovirus recombinantes y de la cepa AcNPVRP8 de baculovirus. Esta última se caracteriza por no expresar la proteína poliedrina y se utilizó como control negativo de expresión a lo largo de todo el estudio.

La línea celular CaCo-2 se utilizó para la propagación de una cepa de astrovirus humano serotipo 1 (HAstV-1) adaptada a cultivo celular.

En el apartado 7.1 se detallan la manipulación y características de las líneas celulares así como el origen de las diferentes cepas víricas.

5.2.2. Construcción de Baculovirus Recombinantes

El primer paso a realizar fue la construcción de los tres baculovirus recombinantes cuyos genomas incorporasen, respectivamente, el ORF2 entero del HAstV-1 (Acc. N° L23513), la forma truncada por el extremo 5' del ORF2 (Δ ORF2, con una delección de los 70 primeros aminoácidos), y una fusión entre el gen de la GFP de la especie *Aequorea victoria* y el Δ ORF2 (GFP Δ ORF2). A estos baculovirus se les denominó a lo largo de todo el estudio AcNPV-ORF2, AcNPV- Δ ORF2 y AcNPV-GFP Δ ORF2, respectivamente.

Para la construcción de los diferentes baculovirus recombinantes se utilizó el sistema *Bac-to-Bac Expression System* (Invitrogen). La amplificación de las diferentes secuencias

correspondientes al ORF2 del genoma del HAstV-1 se realizó a partir del vector pAVIC6 que incorpora el ADNc completo del genoma de HAstV-1 (Acc. Nº L23513) construido por Geigenmüller y col. (1997), y cedido a nuestro laboratorio por S. Matsui de la Universidad de Stanford en California (USA). Para la amplificación de la secuencia correspondiente al genoma de la GFP se utilizó el vector pEGFP-1 (BD Biosciences) (Paso 1, Figura 5.1).

El ORF2, situado entre los nucleótidos 4328 y 6691 del ADNc de HAstV-1, se amplificó utilizando los cebadores A4328 (5'-AGGAC**GCGGCCGCCACCATGG**CTAGCAAGTCCAA TAAGC-3') que contiene una diana para la enzima de restricción Not I (en negrita) y la señal de Kozak de unión del ribosoma (subrayada) (Kozak, 1989), y A6691 (5'-TACC**CTGCAG**CTACTCGGCGTGGCCGCGGCT-3') que contiene una diana para la enzima de restricción Pst I (en negrita).

El Δ ORF2, situado entre los nucleótidos 4538 y 6691 del ADNc de HAstV-1, se amplificó utilizando los cebadores A4538 (5'-ACATT**GCGGCCGCCACCATGGG**TAAACAGGGTGT CACAGGACCAAACC-3') que contiene una diana para la enzima de restricción Not I (en negrita) y la señal de Kozak de unión del ribosoma (subrayada), y A6691.

El GFP Δ ORF2 se obtuvo tras fusionar los productos de PCR obtenidos a partir de la amplificación del gen de la GFP y del Δ ORF2. El gen de la GFP se amplificó con los cebadores NtGFP (5'-CGCTAG**GCGGCCGCCACCATGG**TGAGCAAGGGCGAGGAGC-3') que contiene una diana para la enzima de restricción Not I (en negrita) y la señal de Kozak de unión del ribosoma (subrayada), y CtGFP (5'-GGATCCT**TCTAG**ACATGTGGTGGTGGT GGTGGT-3') que contiene una diana para la enzima de restricción Xba I (en negrita). El Δ ORF2 se amplificó con los cebadores Nt Δ ORF2 (5'-TCAAT**TCTAGAGGATCC**AAACAGGG TGTCACAGGACCAA-3') que contiene una diana para la enzima de restricción Xba I (en negrita) y un tetrapéptido flexible que codifica para los aminoácidos SRGS (subrayado), y el A6691. Ambos amplímeros fueron digeridos con la enzima Xba I y ligados entre sí.

En todas las reacciones de PCR llevadas a cabo se utilizó la enzima *Pwo DNA polymerase* (Roche) (ver apartado 7.6) siguiendo el programa de amplificación detallado a continuación: desnaturalización de 3 min a 95 °C; 35 ciclos de amplificación desglosados en 45 sec a 95 °C, 30 sec a 65 °C y 2 min a 72 °C; y una elongación final de 7 min a 72 °C.

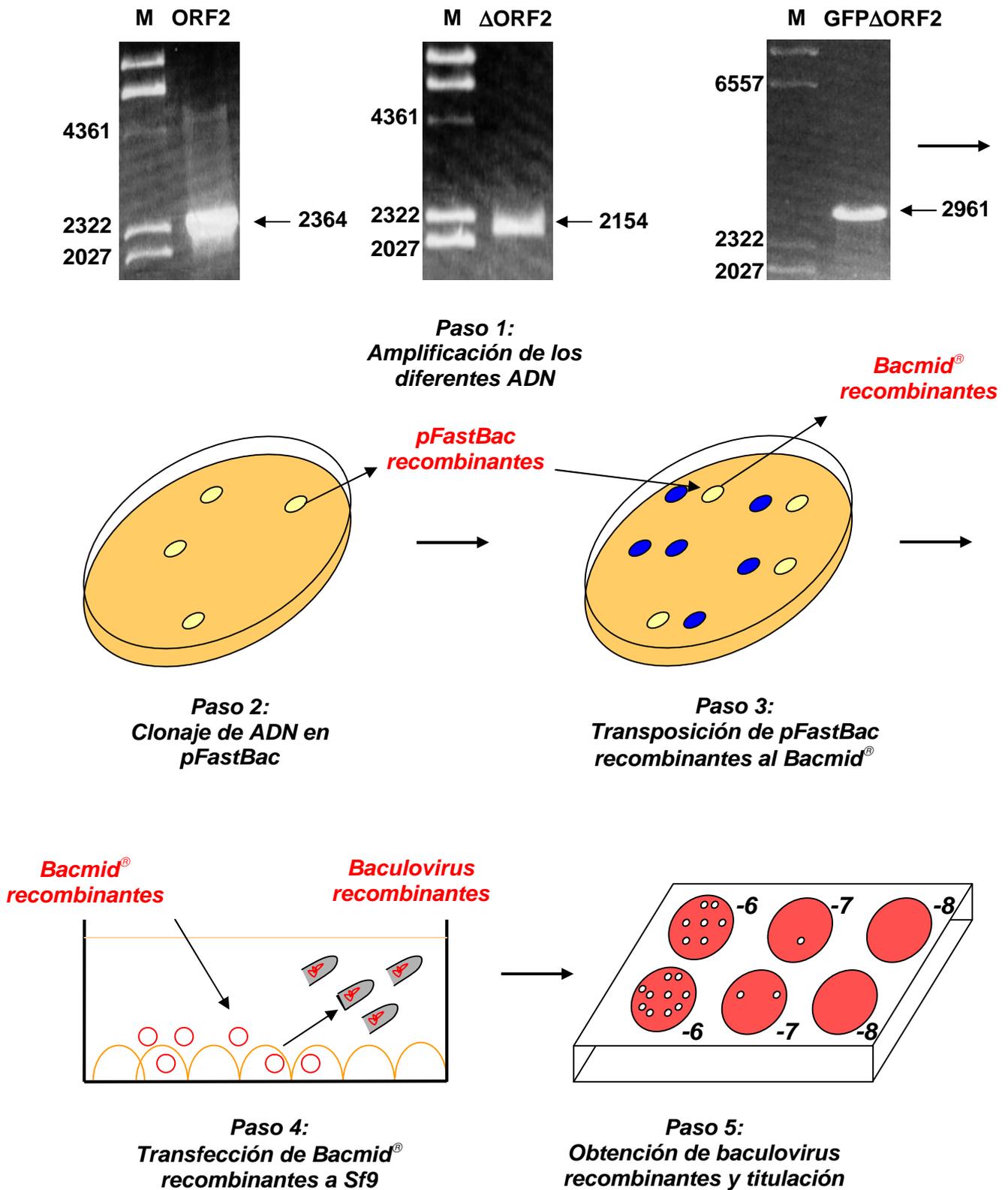


Figura 5.1: Esquema de la construcción de los baculovirus recombinantes; donde **M**: marcador de peso molecular. Pesos moleculares expresados en pares de bases.

Los diferentes productos de amplificación, ORF2 (2364 pb), Δ ORF2 (2154 pb) y GFP Δ ORF2 (2961 pb), fueron digeridos con las enzimas de restricción Not I y Pst I y clonados dentro del vector pFastBac (Invitrogen) linearizado con las mismas enzimas. Células competentes *Library Efficiency E. Coli DH5 α* fueron transformadas con los distintos productos de clonación utilizando como antibiótico de selección la ampicilina a una concentración de 100 μ g/ml (ver apartado 7.10) (Paso 2, Figura 5.1).

La inserción del fragmento en el vector de células transformadas fue confirmada por hibridación molecular de ácidos nucleicos con una sonda de ADNc de 412 pb marcada con digoxigenina y específica de una región del ORF2 del genoma de HAstV-4.

Para ello, se hicieron estrías de las colonias transformadas sobre una membrana de nylon en contacto con agar LB suplementado con 100 μ g/ml de ampicilina y se incubaron durante 3 h a 37 °C. Tras el periodo de crecimiento, la membrana de nylon se puso en contacto durante 15 min con solución desnaturalizante (0.5N NaOH, 1.5M NaCl y 0.1% SDS), durante 5 min más con solución de neutralización (1.5M Tris HCl pH 7.5 y 1.5M NaCl) y durante 15 min más con solución 2X SSC (ver pág 163). Tras dejar secar la membrana, los ácidos nucleicos fueron fijados a ésta por tratamiento con radiación ultravioleta durante 3 min e incubación a 120 °C al vacío durante 20 min. La hibridación molecular de ácidos nucleicos para detectar el inserto se realizó tal y como se detalla en el apartado 7.5.2 utilizando un revelado cromogénico.

Para confirmar que la inserción se había realizado en el lugar y orientación correctos, se realizó un análisis de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción con toda una batería de enzimas de restricción.

Aquellos clones para los que se confirmó la correcta inserción del fragmento se utilizaron para la obtención de los diferentes baculovirus recombinantes. Con este fin, para cada uno de los clones recombinantes, se transformaron células competentes *E. coli DH10Bac* (Invitrogen) (ver apartado 7.10) utilizando como antibióticos de selección la kanamicina a 50 μ g/ml, la gentamicina a 7 μ g/ml y la tetraciclina a 10 μ g/ml y en medio LB suplementado con 100 μ g/ml X-Gal y 40 μ g/ml IPTG. Las células competentes *E. coli DH10Bac* se caracterizan por poseer el *Bacmid*[®] (Invitrogen), un genoma circular homólogo al de baculovirus en el que se ha sustituido el gen de la poliedrina por el gen *lacZ α* . Las características del *Bacmid*[®] permiten la transposición del fragmento clonado en el vector pFastBac justo detrás del promotor de la poliedrina, truncando el gen *lacZ α* y dando lugar a colonias de fenotipo color

blanco en caso de transposición positiva. En aquellas células donde no se haya dado la transposición, el fenotipo de la colonia era azul (Paso 3, Figura 5.1).

Para algunas de las colonias positivas para la transposición se confirmó si ésta se había realizado en el lugar y orientación correctos mediante PCR con una combinación de cebadores externos al lugar de la transposición e internos al fragmento clonado.

Finalmente, para generar los baculovirus recombinantes, los correspondientes *Bacmid*[®] recombinantes fueron transfectados a células Sf9 (ver apartado 7.13). Tras la transfección, los baculovirus recombinantes fueron recuperados a partir de los sobrenadantes de los cultivos infectados (Paso 4, Figura 5.1).

La determinación del título vírico, así como la obtención de nuevas suspensiones víricas se realizaron tal y como se detalla en el apartado 7.2 (Paso 5, Figura 5.1).

5.2.3. Expresión de Proteínas Recombinantes

Una vez obtenidos los baculovirus recombinantes, se evaluó la capacidad de expresar las proteínas de las construcciones clonadas mediante la infección de células Sf9. Infecciones con el baculovirus AcNPVRP8 se utilizaron como controles negativos de expresión.

La expresión de la proteína se evaluó tanto a partir de la fracción celular como de los sobrenadantes de los cultivos. En el primer caso, 1.2×10^7 células Sf9 eran sembradas en un frasco de 75 cm² e infectadas a una m.o.i. de 5-10 con cada uno de los baculovirus recombinantes (ver apartado 7.2.2 para células adheridas al soporte plástico). El medio post-infección era TC-100 suplementado con un 1% SFBi y diariamente se adicionaban los inhibidores de proteasas Aprotinina (Sigma) y Leupeptina (Sigma) a una concentración final de 0.5 µg/ml. A las 72 horas post-infección, las células infectadas eran recuperadas por centrifugación del cultivo a 1.000 g durante 10 min, siendo resuspendidas en 1 ml de tampón de lisis (tampón TN + 2% *Nonidet-P40*) e incubadas durante 1 h a 4 °C.

En el segundo caso, 1.2×10^8 células Sf9 eran infectadas a una m.o.i. 5-10 con cada uno de los baculovirus recombinantes (ver apartado 7.2.2 para células en suspensión) en las mismas condiciones mencionadas con anterioridad. A los 6 días post-infección, el medio del cultivo era clarificado por doble centrifugación, primero a 1.000 g durante 10 min para descartar los restos celulares, y luego a 22.000 g durante 30 min para descartar los

baculovirus. El cultivo clarificado era concentrado a través de un cojín de sacarosa del 35% (p/p) en H₂O_{bd} y resuspendido en 1 ml de tampón TN.

Tanto el extracto celular como el concentrado del medio de cultivo fueron analizados tras SDS-PAGE en gel de poliacrilamida al 10% por tinción con Azul de Comassie o *western blot*. El anticuerpo primario utilizado en el revelado del *western blot* correspondió a un policlonal de conejo anti-HAstV-1 cedido por el Dr. D. M. Bass de la Universidad de Stanford en California (USA) (ver apartado 7.14). Tanto para la tinción con Azul de Comassie como para el *western blot* se utilizaron como controles negativos extractos celulares y concentrados de medio de cultivo provenientes de cultivos infectados con el AcNPVRP8.

Finalmente, la expresión de las proteínas ORF2 y ΔORF2, así como su localización subcelular, se determinó mediante inmunofluorescencia de células Sf9 infectadas (ver apartado 7.12) utilizando como anticuerpo primario el monoclonal 8E7 o el anticuerpo policlonal de conejo anti-HAstV-1 y anticuerpos secundarios conjugados con fluoresceína (FITC). La expresión y localización subcelular de GFPΔORF2 se determinó por observación directa de la autofluorescencia de células Sf9 infectadas con el baculovirus AcNPV-GFPΔORF2 bajo el microscopio de fluorescencia. En todos los casos se utilizaron células Sf9 infectadas con el AcNPVRP8 como control negativo de fluorescencia.

5.2.4. Purificación de VLPs en Gradientes de Sacarosa y de CsCl

Una vez confirmada la correcta expresión de proteína por los diferentes baculovirus recombinantes, tanto las fracciones solubles de los extractos celulares (obtenidas tras recuperar el sobrenadante después de centrifugación a 14.000 g durante 5 min) como los concentrados de medio de cultivo fueron cargados sobre gradientes preformados de sacarosa del 0% al 45% (p/p) en tampón TN y de CsCl del 0% al 50% (p/p) en tampón TN de 9 ml con el fin de purificar la proteína expresada y determinar si se formaban VLPs.

De forma paralela también se cargó 1 ml de suspensión vírica concentrada de HAstV-1 (ver apartado 7.2.1) obtenida con tampón TN con el fin de tener un patrón de referencia con el que comparar los resultados obtenidos con los diferentes productos recombinantes.

Ambos tipos de gradientes tenían un volumen de 10 ml totales y eran ultracentrifugados en un rotor SW41 (Beckman). Los gradientes de sacarosa se centrifugaban a 200.000 g durante 2 h 45 min, mientras que la centrifugación de los de CsCl se realizaba a 150.000 g durante 16 h. Al finalizar la ultracentrifugación, los gradientes eran fraccionados y se

determinaba la densidad de cada una de las fracciones en función de sus índices de refracción.

Con el fin de determinar en qué fracciones habían sedimentado los productos de expresión, se realizó un E.L.I.S.A. de cada una de las fracciones separadas para detectar la proteína vírica (ver apartado 7.3).

5.2.5. Microscopía Electrónica de Transmisión

Las fracciones correspondientes a los diferentes picos antigénicos de los gradientes fueron dializadas frente a tampón TN durante 24 h a 4 °C. La presencia de VLPs en estas fracciones fue evaluada por observación al microscopio electrónico de transmisión.

Las preparaciones microscópicas se prepararon sobre un bloque de agarosa al 1% donde se colocaba una alícuota de 10 µl de cada fracción y encima una rejilla de cobre carbonatada de 400-*mesh*. Tras un periodo de adsorción de la muestra a la rejilla de 30 min, la preparación era teñida con PTA al 2% (pH 6.4) durante 1 min 30 sec. Finalmente, la preparación era examinada bajo microscopio electrónico de transmisión Hitachi H600AB.

Para confirmar la naturaleza vírica de las diferentes estructuras observadas en el microscopio electrónico se realizó una inmunoagregación o un marcaje inmunológico con anticuerpos conjugados con oro coloidal utilizando como anticuerpo primario el anticuerpo policlonal de conejo anti-HAstV-1 mencionado con anterioridad.

Para el ensayo de inmunoagregación, 10 µl de muestra eran incubados con el anticuerpo a una dilución 1/5000 durante 1 h a 37 °C. Posteriormente, la muestra era adsorbida sobre una rejilla de cobre y tras ser teñida con PTA (pH 6.4), era observada bajo el microscopio electrónico. La presencia de agregados de las estructuras que anteriormente se encontraban monodispersadas era indicativa de una reacción positiva del producto recombinante con el anticuerpo, confirmando así su naturaleza vírica.

Para el ensayo de marcaje inmunológico con oro coloidal, 10 µl de muestra eran adsorbidos sobre una rejilla. A continuación, la rejilla era bloqueada con tampón PBS suplementado con un 1% de SFB y un 0.1% de Tween-20 durante un periodo de 15 min. Seguidamente, la rejilla se incubaba con el anticuerpo policlonal de conejo anti-HAstV-1 a una dilución 1/5000 durante 1 h a 37 °C. Finalmente, tras lavar la rejilla con agua destilada, ésta era incubada con un anticuerpo secundario marcado con oro coloidal de 10 nm. Tras teñir las rejillas con

PTA (pH 6.4) y observar las preparaciones bajo el microscopio electrónico, la presencia de oro coloidal alrededor de cualquier tipo de estructura vírica era indicativa de una reacción positiva confirmando así su naturaleza.

5.2.6. Desensamblaje y Reensamblaje de VLPs

Para determinar el efecto de la presencia de agentes quelantes de iones divalentes en la purificación de las VLPs, se obtuvieron fracciones solubles de extractos celulares infectados con los diferentes baculovirus recombinantes y se purificaron en gradientes de CsCl tal y como se describe en el apartado 5.2.4 pero utilizando tampón TNE en vez de tampón TN.

De forma paralela también se purificó una suspensión vírica concentrada de HAsV-1 (ver apartado 7.2.1) obtenida en tampón TNE con el fin de tener un patrón de referencia con el que comparar los resultados obtenidos con los diferentes productos recombinantes.

Tras fraccionar los gradientes y determinar mediante E.L.I.S.A. la posición de los diferentes picos antigénicos dentro del gradiente, éstos fueron dializados frente a tampón TNE durante 24 h a 4 °C. La presencia de estructuras de origen vírico fue examinada bajo el microscopio electrónico de transmisión tal y como se ha descrito en el apartado anterior.

Para determinar si el efecto del EDTA sobre las VLPs era reversible, los picos antigénicos de los gradientes de CsCl realizados con tampón TNE fueron dializados frente a tampón TN suplementado con 10 mM MgCl₂ (tampón TNMg) con el fin de sustituir el agente quelante EDTA por iones divalentes. Las muestras obtenidas tras la diálisis fueron examinadas de nuevo bajo el microscopio electrónico.

5.2.7. Inmunoprecipitación

Para determinar la composición proteica tanto de las VLPs como de los anillos de 16 nm obtenidos para las tres construcciones se realizó una inmunoprecipitación con el anticuerpo policlonal de conejo anti-HAsV-1.

Para ello, se incubaron las VLPs y los anillos purificados en gradientes de CsCl con una dilución 1/100 del anticuerpo durante 12 h a 4 °C. A continuación, la suspensión se incubó con Proteína A - agarosa (Roche) durante 4 h a 4 °C con el fin de recuperar los complejos antígeno-anticuerpo tras una centrifugación de 5 min a 12.000 g. El precipitado fue lavado con Tris-HCl 10mM (pH 8) suplementado con 0.1% *Nonidet-P40*, y tras una nueva

centrifugación de 5 min a 12.000 g, el nuevo precipitado fue resuspendido en 40 µl de tampón TN (para las VLPs) o TNE (para los anillos).

Los productos de inmunoprecipitación fueron cargados en un gel de poliacrilamida para realizar electroforesis SDS-PAGE y *western blot* (ver apartado 7.14). El anticuerpo primario utilizado en el revelado del *western blot* fue el mismo anticuerpo policlonal de conejo que se usó para la inmunoprecipitación.

5.2.8. Programas informáticos para el análisis de la poliproteína estructural

El estudio en 1D y 3D de la secuencia aminoacídica de la poliproteína de 87 kDa del HAsTV-1 (Acc. Nº L23513), por lo que se refiere al plegamiento de la proteína y a la determinación de estructuras secundarias en comparación con las proteínas de la cápside de otros virus, se realizó utilizando el programa 3D-PSSM V2.6.0 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/servers/3dpssm>).

5.3. RESULTADOS

5.3.1. Análisis de los Productos de Expresión

Una vez contruidos los diferentes baculovirus recombinantes (AcNPV-ORF2, AcNPV- Δ ORF2 y AcNPV-GFP Δ ORF2), y obtenidas suspensiones víricas con un título próximo a las 10^8 UFC/ml, se infectaron células Sf9 a una m.o.i. de 5-10. Los productos de expresión, tanto a partir de extractos celulares como de concentrados de medios de cultivos, se analizaron por SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 10%.

Tras la tinción con Azul de Comassie se observó la presencia de proteínas con pesos moleculares de 87 kDa (ORF2), 79 kDa (Δ ORF2) y 110 kDa (GFP Δ ORF2) para los diferentes clones en comparación con el producto de expresión obtenido con el control negativo (AcNPVRP8). Estas proteínas tenían el peso molecular esperado en función del clon con el que se había realizado la infección (Figura 5.2.A). Cuando los productos de expresión eran analizados por *western blot*, estas proteínas eran reconocidas específicamente por el anticuerpo policlonal de conejo anti-HAstV-1 (Figura 5.2.B). Además de estas proteínas, otras proteínas de menor tamaño y en cantidad inferior también fueron reconocidas por el anticuerpo en comparación con el control negativo de expresión. La presencia de estas proteínas de menor tamaño podría explicarse por la degradación inespecífica de la proteína principal por la acción de proteasas celulares.

Por lo que hace referencia a los productos de recombinación obtenidos a partir de extractos celulares, se observó que cuando se separaban por centrifugación la fracción soluble de la fracción insoluble, la mayoría de la proteína recombinante se detectaba en la fracción

insoluble sugiriendo una fuerte asociación de estas proteínas a membranas celulares. Diferentes detergentes no iónicos como *Nonidet P-40*, *Triton X-100* y *Tween-20*, fueron utilizados a una concentración final del 2% para intentar solubilizar una mayor cantidad de proteína, pero en ninguno de los casos se incrementó la cantidad de proteína en la fracción soluble (datos no mostrados).

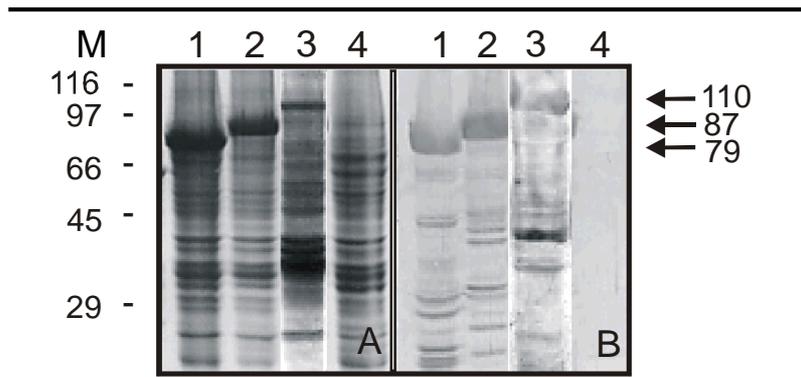


Figura 5.2: Análisis de los productos de expresión por SDS-PAGE y tinción con Azul de Coomassie (A) o *western blot* (B); donde M: marcador de pesos moleculares, 1: Δ ORF2, 2: ORF2, 3: GFP Δ ORF2 y 4: Negativo. Pesos moleculares expresados en kDa.

Finalmente, la detección de las proteínas recombinantes en células Sf9 infectadas mostraron una localización subcelular mayoritariamente citoplasmática, tanto para los productos ORF2 y Δ ORF2 por inmunofluorescencia, como para el producto GFP Δ ORF2 por observación directa de la fluorescencia, (Figura 5.3). Los resultados de la inmunofluorescencia fueron idénticos independientemente de qué anticuerpo primario se utilizase, el MAb 8E7 o el anticuerpo policlonal de conejo.

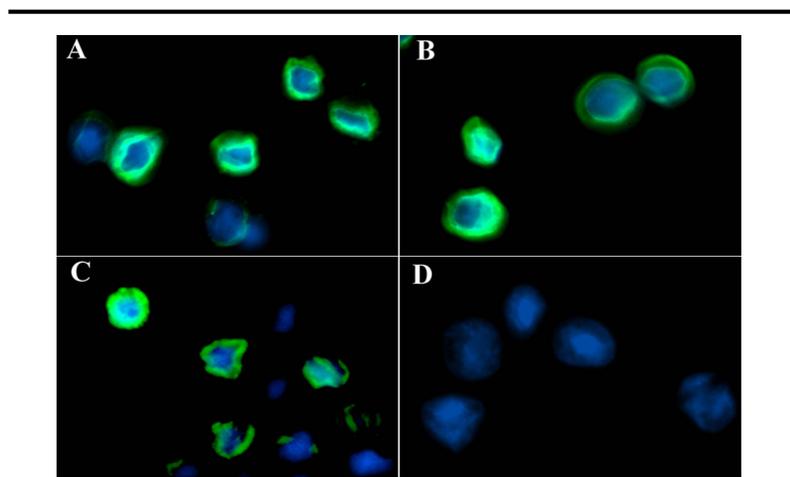


Figura 5.3: Inmunofluorescencia con el MAb 8E7 de células Sf9 infectadas con AcNPV- Δ ORF2 (A), AcNPV-ORF2 (B) y AcNPVVRP8 (D) y autofluorescencia de células Sf9 infectadas con AcNPV-GFP Δ ORF2 (C).

5.3.2. La Expresión del ORF2, Δ ORF2 ó GFP Δ ORF2 Conduce a la Formación de VLPs

Para esclarecer si los diferentes productos recombinantes se ensamblaban dando lugar a VLPs, éstos fueron purificados en gradientes preformados de sacarosa y de CsCl.

Las fracciones de los gradientes fueron analizadas por E.L.I.S.A. para determinar a qué densidades habían sedimentado las diferentes estructuras víricas producidas.

En el caso de la purificación mediante gradientes de sacarosa, los productos de expresión obtenidos a partir de las fracciones solubles de extractos celulares dieron lugar, para todas las construcciones, a tres picos antigénicos con densidades de 1.05, 1.08 y 1.12 g/ml. Por otro lado, los concentrados de medio de cultivo únicamente mostraron un pico antigénico con densidad 1.12 g/ml (Figura 5.4). En ambos casos, las fracciones de los gradientes correspondientes a los controles negativos de expresión mostraron antigenicidades muy bajas y ausencia absoluta de picos antigénicos a lo largo de los gradientes.

Cuando suspensiones víricas concentradas de HAstV-1 eran purificadas en gradientes de sacarosa, se obtuvieron tres picos antigénicos con densidades de 1.05, 1.12 y 1.14 g/ml al igual que sucedía con el HAstV-4 (Figura 3.2, Estudio I), correspondiendo a proteína soluble no estructurada, partículas víricas no infecciosas y partículas víricas infecciosas respectivamente.

La comparación directa entre los resultados obtenidos con los productos recombinantes y los obtenidos con el HAstV-1, sugería que en el caso de los productos recombinantes, el pico antigénico con densidad 1.05 g/ml correspondía a material proteico no estructurado, el pico con densidad 1.12 g/ml a partículas víricas (VLPs) y el pico con densidad 1.08 g/ml a un estadio morfogénico intermedio entre la proteína soluble y las VLPs.

Los gradientes de sacarosa se caracterizan por realizar una separación de las estructuras presentes en una muestra en base al peso de éstas, con lo que son ideales para la identificación de diferentes estados morfogénicos dentro de una misma muestra (Sánchez y col., 2003).

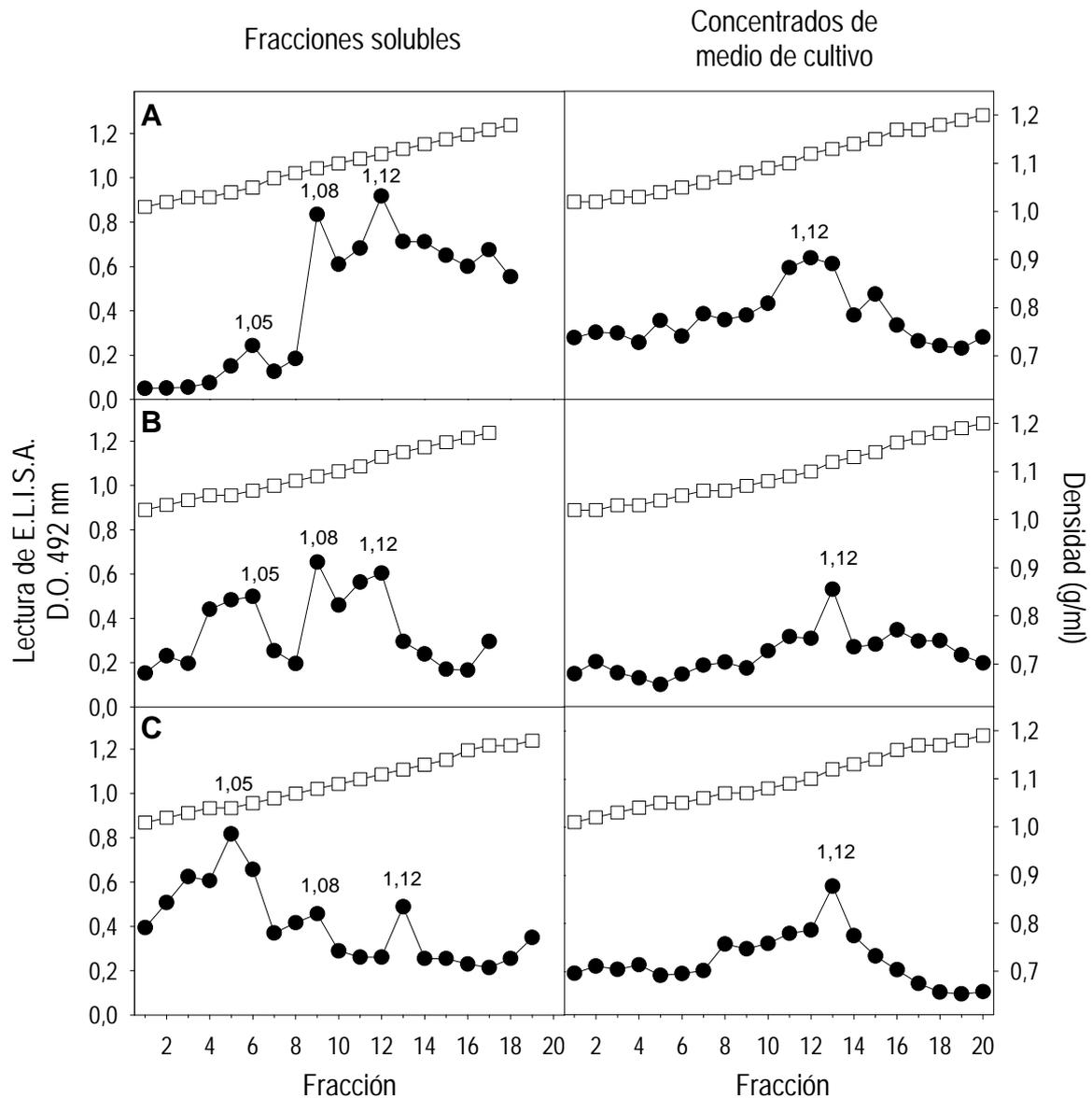


Figura 5.4: Gráficas de antigenicidad de las fracciones de los gradientes de sacarosa de los diferentes productos recombinantes; donde A: ORF2, B: Δ ORF2 y C: GFP Δ ORF2. Los símbolos negros (•) corresponden a la antigenicidad y los símbolos blancos (o) corresponden a la densidad de cada fracción.

Cuando la purificación se realizaba en gradientes de CsCl, los diferentes productos de expresión obtenidos tanto a partir de las fracciones solubles de extractos celulares como de los concentrados de medio de cultivo dieron lugar, para todas las construcciones, a un único pico antigénico con densidad de 1,28 g/ml (Figura 5.5). Los controles negativos de expresión volvieron a evidenciar una ausencia total de antigenicidad a lo largo de los gradientes. El pico de antigenicidad con densidad 1,28 g/ml se correspondía con una banda macroscópicamente visible en medio del gradiente de CsCl (Figura 5.7).

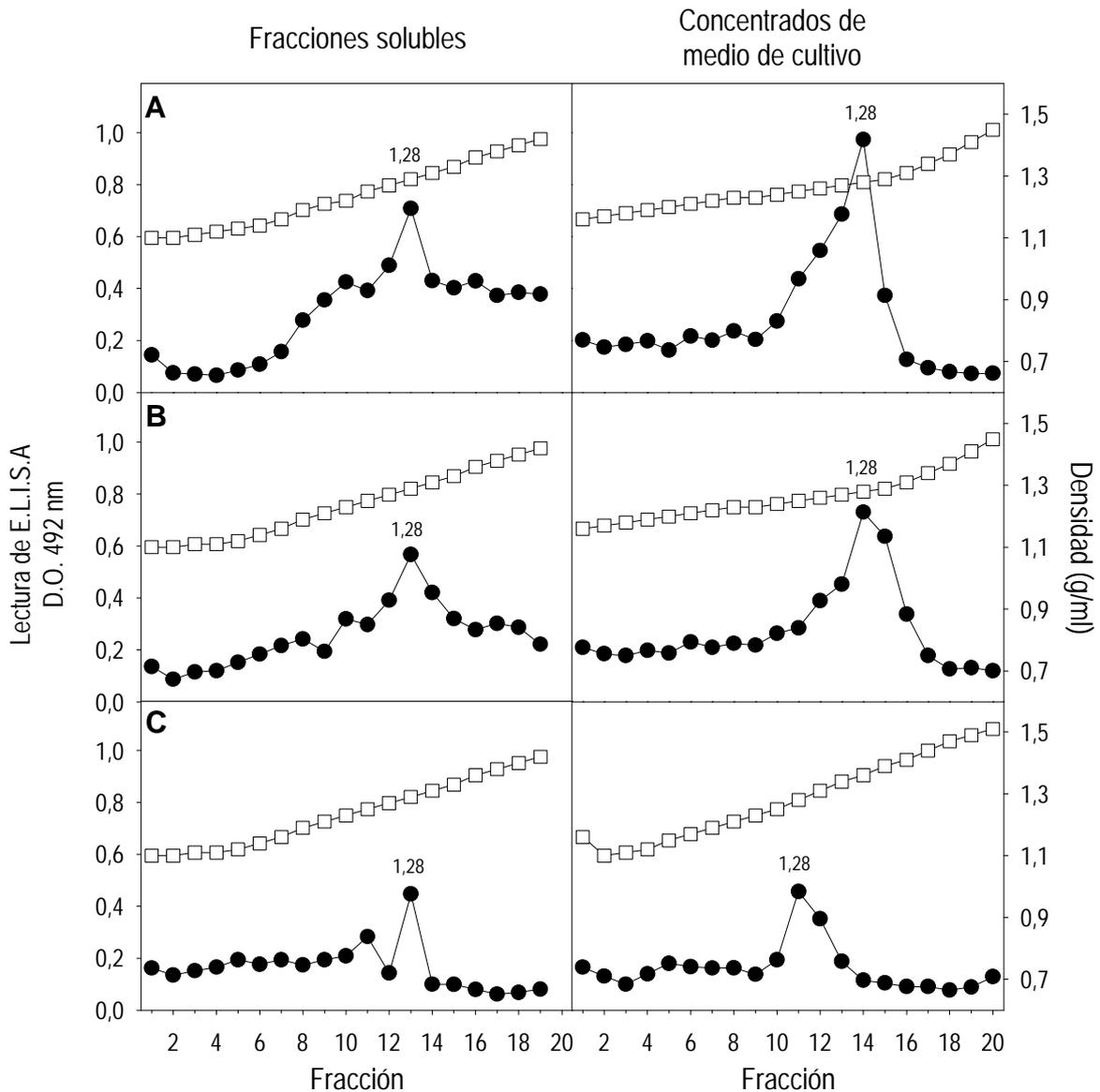


Figura 5.5: Gráficas de antigenicidad de las fracciones de los gradientes de CsCl de los diferentes productos recombinantes; donde A: ORF2, B: Δ ORF2 y C: GFP Δ ORF2. Los símbolos negros (●) corresponden a la antigenicidad y los símbolos blancos (○) corresponden a la densidad de cada fracción.

Los gradientes de CsCl se caracterizan por realizar una separación de las estructuras en base a su densidad y no a su peso, con lo que son preferentemente utilizados para la concentración de estructuras con una misma composición bioquímica.

Cuando suspensiones víricas concentradas de HAstV-1 eran purificadas en gradientes de CsCl, se obtenían dos picos antigénicos con densidades de 1.28 y 1.34 g/ml (Figura 5.6). La presencia de dos picos antigénicos en este tipo de gradientes ya había sido descrita con

anterioridad por Willcocks y col. (1990) y Matsui y col. (1993) quienes confirmaron que el pico más denso correspondía a partículas víricas con ácido nucleico (virus infecciosos) y el menos denso a partículas víricas sin ácido nucleico (virus no infecciosos).

La comparación directa entre los resultados obtenidos con los productos recombinantes y con el HAstV-1, nos sugería que, para los productos recombinantes, el pico antigénico con densidad 1.28 g/ml correspondía a una mezcla de proteína soluble y partículas víricas (VLPs).

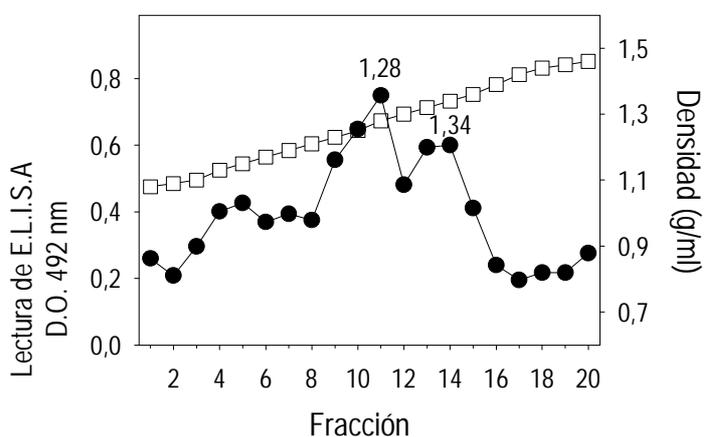


Figura 5.6: Gráficas de antigénicidad de las fracciones de los gradientes de CsCl de HAstV-1. Los símbolos negros (●) corresponden a la antigénicidad y los símbolos blancos (o) corresponden a la densidad de cada fracción.

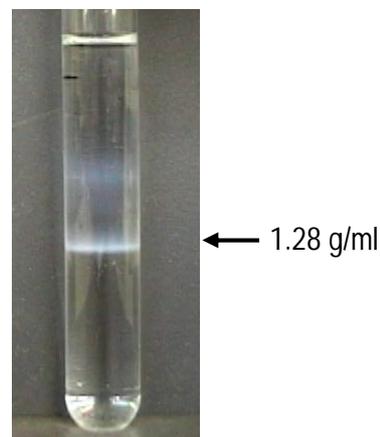


Figura 5.7: Gradiente de CsCl del producto ORF2.

Para confirmar qué tipo de estructuras de origen vírico nos encontrábamos en cada uno de los picos antigénicos de los diferentes gradientes de los productos recombinantes, éstos fueron observados bajo microscopio electrónico de transmisión.

En los picos antigénicos de los productos recombinantes de los diferentes gradientes que coincidían con los picos antigénicos de virus no infecciosos (sin ácido nucleico) en la purificación de HAstV-1, es decir, con densidad 1.12 g/ml para los gradientes de sacarosa y 1.28 g/ml para los gradientes de CsCl, se confirmó la presencia de VLPs de un tamaño aproximado de 38 nm de diámetro (Figura 5.8, fotos A, B, C, G, H e I). La naturaleza vírica de estas VLPs fue confirmada mediante marcaje con anticuerpos específicos frente astrovirus conjugados con oro coloidal (Figura 5.8, fotos J, K y L).

En el pico con densidad 1.05 g/ml de los gradientes de sacarosa no se observó ningún tipo de estructura de origen vírico, al igual que sucedía en la purificación de HAstV-1, con lo que este pico se pudo asociar a proteína vírica soluble no estructurada.

En el caso del pico con densidad 1.08 g/ml de los gradientes de sacarosa, se observó una mezcla de VLPs junto con unas estructuras en forma de anillo de unos 16 nm de diámetro (Figura 5.8, fotos D, E y F). Ambas estructuras se encontraron en bajo número. La presencia de dos tipos de estructuras en la misma fracción del gradiente podía explicarse por una contaminación cruzada entre fracciones en el proceso de fraccionamiento del gradiente o por la tendencia de un tipo de estructura en dar lugar a la segunda.

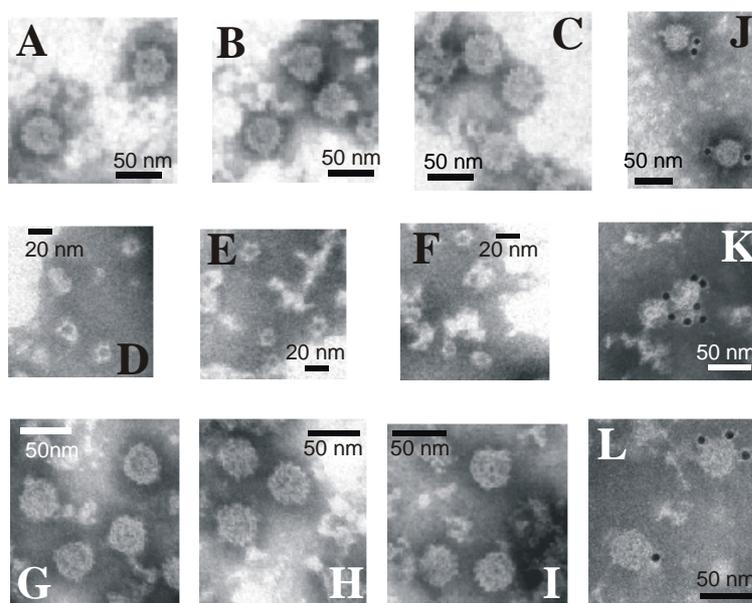


Figura 5.8: Micrografías de M.E.T. de los picos antigénicos de los productos recombinantes purificados en gradientes de sacarosa y de CsCl; donde ORF2: fotos A, D y G; Δ ORF2: fotos B, E, y H; GFP Δ ORF2: fotos C, F, e I; Pico antigénico de gradiente de sacarosa de 1.12 g/ml: fotos A, B, C; Pico antigénico de gradiente de sacarosa de 1.08 g/ml: fotos D, E y F; Pico antigénico de gradiente de CsCl de 1.28 g/ml: fotos G, H e I; Marcaje de VLPs del producto ORF2 con anticuerpos conjugados con oro coloidal: fotos J, K y L.

Con el fin de profundizar un poco más en la caracterización de las proteínas solubles no estructuradas (1.05 g/ml) y los anillos de 16 nm (1.08 g/ml), se realizó una segunda purificación de ambas estructuras obtenidas a partir de la expresión ORF2 en un segundo gradiente de sacarosa analizando las fracciones resultantes por E.L.I.S.A.

La proteína soluble no estructurada volvió a sedimentar a la misma densidad que en el primer gradiente sin que apareciese ningún pico antigénico nuevo a lo largo del segundo gradiente (Figura 5.9.A).

Sin embargo, el producto correspondiente a los anillos de 16 nm (con densidad de 1.08 g/ml) evolucionó hacia la aparición de los tres picos antigénicos característicos de la purificación de un producto de expresión mediante gradiente de sacarosa (1.05, 1.08 y 1.12 g/ml) (Figura 5.9.B).

Estos resultados dieron a entender que la proteína soluble no estructurada era incapaz de ensamblarse en estadios morfogénicos intermedios o VLPs, mientras que los anillos de 16 nm se correspondían con un estadio intermedio en la morfogénesis de la VLP capaz de desensamblarse dando lugar a proteína soluble o evolucionar hacia la formación de VLPs.

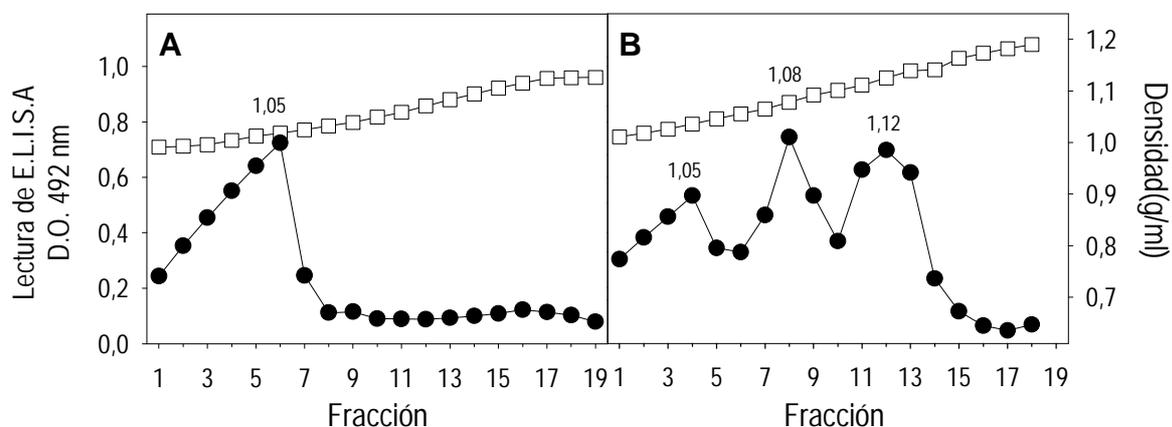


Figura 5.9: Gráficas de antigenicidad de las fracciones de los gradientes de sacarosa de los picos antigénicos de 1.05 g/ml (A) y de 1.08 g/ml (B) del producto recombinante ORF2. Los símbolos negros (•) corresponden a la antigenicidad y los símbolos blancos (o) corresponden a la densidad de cada fracción.

5.3.3. Desensamblaje y Reensamblaje de VLPs

Con el fin de evaluar el papel de los anillos de 16 nm en la morfogénesis de las VLPs de astrovirus se realizaron una serie de experimentos de desensamblaje y reensamblaje de las VLPs.

De este modo, para desestabilizar las VLPs se sustituyó el tampón TN por el tampón TNE (con 10 mM EDTA como agente quelante de iones divalentes) en la obtención de los productos de expresión y en la formación de los gradientes de CsCl.

Al analizar las fracciones de los gradientes por E.L.I.S.A., se observó la aparición de dos picos antigénicos con densidad 1.18 y 1.28 g/ml (Figura 5.10, A, B y C) en vez de un único pico con densidad 1.28 g/ml.

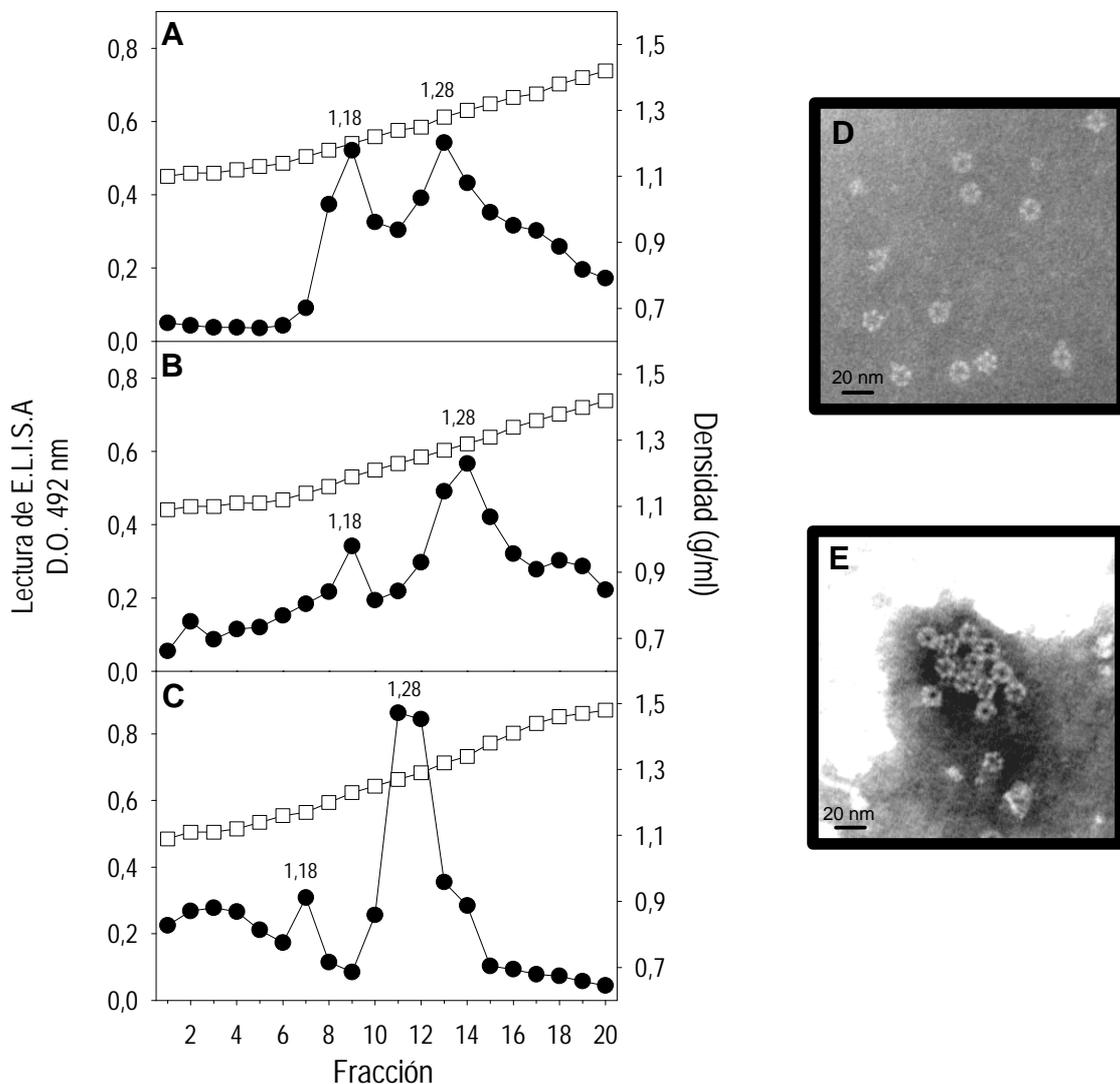


Figura 5.10: Gráficas de antigenicidad de las fracciones de los gradientes de CsCl en tampón TNE de los diferentes productos recombinantes; donde A: ORF2, B: Δ ORF2 y C: GFP Δ ORF2. Los símbolos negros (●) corresponden a la antigenicidad y los símbolos blancos (○) corresponden a la densidad de cada fracción. También se muestra la observación al M.E.T. del pico antigénico con densidad 1.28 g/ml del ORF2 (D) y de la inmunoagregación de los anillos de 16 nm con el anticuerpo policlonal de conejo anti-HAstV-1 (E).

Cuando el pico antigénico con densidad 1.28 g/ml era examinado bajo el microscopio electrónico, se observó la desaparición de las VLPs y la aparición de unos anillos de 16 nm de diámetro en gran número (Figura 5.10.D). La naturaleza vírica de los anillos de 16 nm fue confirmada mediante inmunoagregación con el anticuerpo policlonal de conejo anti-astrovirus (Figura 5.10.E).

Por otro lado, en el pico con densidad 1.18 g/ml no se observó ninguna estructura característica que se pudiese atribuir a una naturaleza vírica.

Para confirmar definitivamente el papel de estos anillos de 16 nm en la morfogénesis de las VLPs de astrovirus se realizaron experimentos de reensamblaje de VLPs. Estos experimentos consistieron en desestabilizar VLPs mediante su purificación en gradientes de CsCl en tampón TNE para generar anillos de 16 nm. Si esta preparación de anillos de 16 nm se dializaba frente tampón TNMg para eliminar el EDTA y añadir iones divalentes, se esperaba que los anillos de 16 nm se encontrasen con las condiciones óptimas para volver a formar VLPs.

De este modo, tras la diálisis frente tampón TNMg, la preparación fue observada bajo el microscopio electrónico poniéndose de manifiesto la desaparición total de los anillos de 16 nm y la aparición de nuevo de VLPs (Figura 5.11).

En otra serie de experimentos, las preparaciones de anillos de 16 nm antes y después de ser dializadas frente TNMg fueron purificadas en gradientes de sacarosa preparados en tampón TNE y en tampón TNMg respectivamente. El análisis por E.L.I.S.A. de las fracciones de los gradientes puso de manifiesto la presencia de picos antigénicos con densidad 1.05 y 1.08 g/ml en el primer caso (Figura 5.11.A) y de 1.05 y 1.12 g/ml en el segundo (Figura 5.11.B). Los picos antigénicos de mayor densidad correlacionaban perfectamente con la densidad que le correspondía a los anillos de 16 nm y a las VLPs respectivamente.

Con todos estos resultados quedaba confirmado que los anillos de 16 nm eran un producto intermedio en la morfogénesis de las VLPs y que el desensamblaje de VLPs era un fenómeno reversible en función de las condiciones químicas en que se encontrasen las estructuras purificadas.

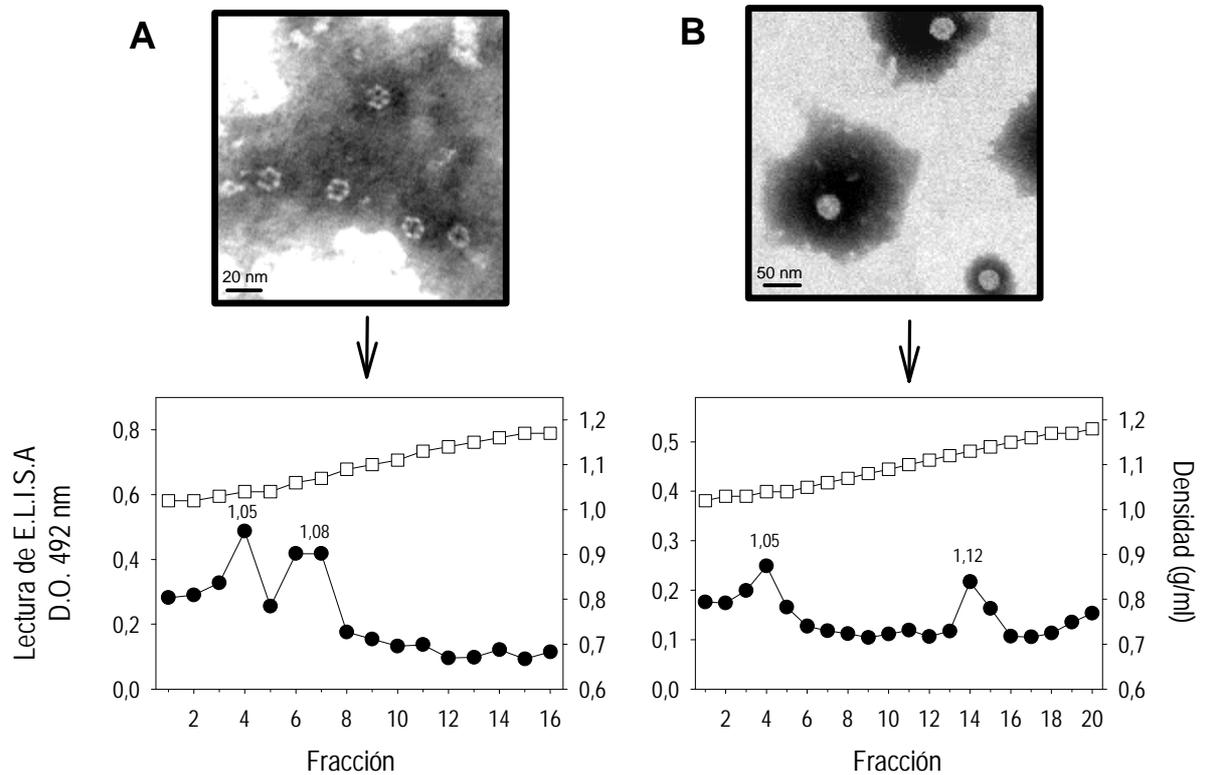


Figura 5.11: Micrografías de M.E.T. de las preparaciones de anillos de 16 nm antes (A) y después (B) de dializar frente a tampón TNMg. También se muestran las gráficas de antigenicidad de los gradientes de sacarosa en tampón TNE (A) o tampón TNMg (B) de la purificación de anillos de 16 nm antes y después de dializar frente TNMg respectivamente. Los símbolos negros (●) corresponden a la antigenicidad y los símbolos blancos (○) corresponden a la densidad de cada fracción.

Finalmente, para ver si este tipo de desestabilización en las VLPs también se producía en el HAstV-1, se realizaron los mismos tipos de experimentos de desestabilización con una suspensión vírica concentrada obtenida en tampón TNE.

El análisis de las fracciones del gradiente por E.L.I.S.A. reveló que el pico correspondiente a los virus sin ácido nucleico (1.28 g/ml) se mantenía, pero que el pico antigénico correspondiente a los virus infecciosos (1.34 g/ml) desaparecía y se generaba uno nuevo con densidad de 1.18 g/ml, al igual que sucedía con los productos recombinantes (Figura 5.12).

Al observar el pico antigénico de 1.28 g/ml bajo el microscopio electrónico, no se observó ningún virus pero sí las estructuras en forma de anillo de 16 nm diámetro. En este caso el número de anillos era muy bajo probablemente debido a que la cantidad de material que se

obtiene a partir de una suspensión vírica es mucho menor que el que se obtiene a partir de un sistema de expresión como puede ser el de baculovirus recombinantes (Figura 5.12).

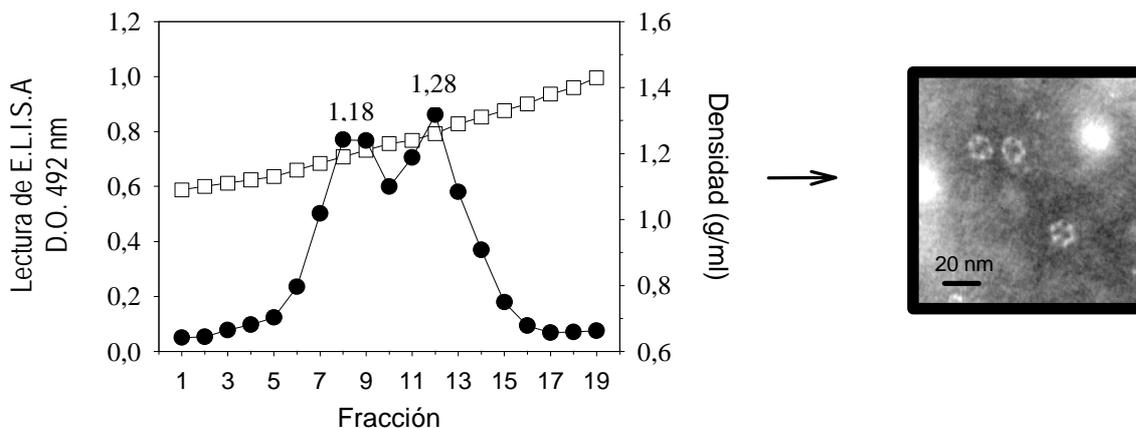


Figura 5.12: Gráfica de antigenicidad de las fracciones del gradiente de CsCl en tampón TNE de HAstV-1. Los símbolos negros (●) corresponden a la antigenicidad y los símbolos blancos (○) corresponden a la densidad de cada fracción. También se muestra la micrografía de M.E.T. del pico antigénico de 1.28 g/ml.

Posteriormente se intentaron realizar los experimentos de reensamblaje de los anillos obtenidos a partir del virus, pero la baja disponibilidad de material imposibilitó la consecución de este objetivo.

5.3.4. Caracterización Antigénica y Bioquímica de las VLPs y los Anillos de 16 nm

Para finalizar el estudio con las VLPs de astrovirus, se realizaron una serie de experimentos que permitieron determinar si algunas propiedades biológicas de los astrovirus eran compartidas entre las VLPs y los anillos de 16 nm.

En primer lugar se determinó el reconocimiento antigénico de las VLPs y los anillos de las tres construcciones por diferentes anticuerpos monoclonales que reconocen astrovirus de forma específica. Los anticuerpos utilizados fueron:

- Ø **8E7**: Reconoce un epítipo del extremo amino-terminal de la poliproteína codificada a partir del ORF2. En el virus maduro reconoce la proteína de 34 kDa (Herrmann y col., 1988).
- Ø **5B7**: Reconoce un epítipo de la parte central de la poliproteína codificada a partir del ORF2. En el virus maduro reconoce las proteínas de 29 y 26 kDa (Bass y Upadhyayula, 1997).

El E.L.I.S.A. se realizó tal y como se describe en el apartado 6.3 recubriendo la placa en un caso con el MAb 8E7; y en el otro con el MAb 5B7. En todos los casos se cargó la misma cantidad de proteína con el fin de detectar diferencias sólo debidas al reconocimiento de cada estructura por los diferentes anticuerpos. Los resultados se muestran en la Tabla 5.1.

Tabla 5.1: Detección por E.L.I.S.A. de las VLPs y los anillos de 16 nm de las diferentes construcciones en la detección por diferentes anticuerpos monoclonales

Lectura E.L.I.S.A. (D.O. 492nm)	ORF2		Δ ORF2		GFP Δ ORF2		Control negativo
	VLPs	Anillos	VLPs	Anillos	VLPs	Anillos	
MAb 8E7	1.232 \pm 0.062	1.246 \pm 0.142	1.247 \pm 0.001	1.254 \pm 0.139	1.240 \pm 0.073	1.295 \pm 0.065	0.214 \pm 0.002
MAb 5B7	0.616 \pm 0.013	1.254 \pm 0.092	0.558 \pm 0.001	0.982 \pm 0.076	0.620 \pm 0.060	1.270 \pm 0.105	0.218 \pm 0.004

Valores de las lecturas de densidad óptica a 492 nm expresados como media \pm desviación estándar.

Los resultados mostraron que tanto las VLPs como los anillos de 16 nm de todas las construcciones eran reconocidos por los dos anticuerpos. Sin embargo, cabe destacar que así como el MAb 8E7 reconocía por igual tanto las VLPs como los anillos, el MAb 5B7 reconocía peor las VLPs que los anillos.

Un segundo experimento se centró en la inmunoprecipitación de las VLPs y los anillos purificados con el anticuerpo policlonal de conejo anti-astrovirus para determinar la composición proteica de ambas estructuras. Los resultados de los *western blot* mostraron que, tanto para las VLPs como para los anillos, una única proteína del peso molecular esperado (en función de la construcción analizada) era inmunoprecipitada. Como control negativo se utilizó un extracto celular infectado con el baculovirus AcNPVRP8 (Figura 5.13).

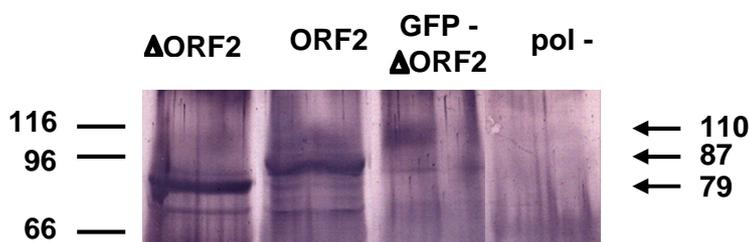


Figura 5.13: *Western blot* de la inmunoprecipitación de las VLPs de las tres construcciones. Para los anillos se obtuvo el mismo resultado.

También se realizó el experimento de inmunoprecipitación pero previamente tratando las muestras con 10 µg/ml tripsina (Sigma GIX) durante 30 min a 37 °C. Con este experimento se pretendía ver si el anticuerpo policlonal era capaz de inmunoprecipitar las VLPs y los anillos tras el tratamiento con tripsina, y si los pesos moleculares de los productos de la inmunoprecipitación coincidían con las proteínas que forman la cápside de HAstV-1 tal y como se describe en la bibliografía (Monroe y col., 1991; Belliot y col., 1997a; y Bass y Qiu, 2000).

En este caso, el *western blot* mostró una gran cantidad de inespecificidades ya que se utilizó como anticuerpo primario el mismo anticuerpo de la inmunoprecipitación. De todas formas, se pudo observar que tanto las VLPs como los anillos de 16 nm presentaban los mismos productos de inmunoprecipitación para cada una de las construcciones.

En primer lugar cabe destacar que las proteínas mayoritarias de 87 kDa, 79 kDa y 110 kDa (en función de la construcción analiza) habían desaparecido por completo tras la digestión con tripsina. En su lugar, para la construcción del ORF2 se detectaron dos proteínas de 34 kDa y 26 kDa, y para las construcciones del Δ ORF2 y GFP Δ ORF2 únicamente se detectó una proteína de unos 26 kDa. Los resultados obtenidos para estas últimas construcciones son coherentes si se tiene en cuenta que en el caso del Δ ORF2, la delección realizada en el extremo 5' del ORF2 hizo que la proteína de 34 kDa pasase a tener un peso de 26 kDa; y que en el caso del GFP Δ ORF2, la fusión de la GFP al Δ ORF2 hizo que la proteína truncada de 26 kDa pasase a tener unos 57 kDa la cual no pudo ser detectada ya que coincidía por tamaño con la inespecificidad debida a la cadena pesada de las inmunoglobulinas utilizadas en la inmunoprecipitación (Figura 5.14).

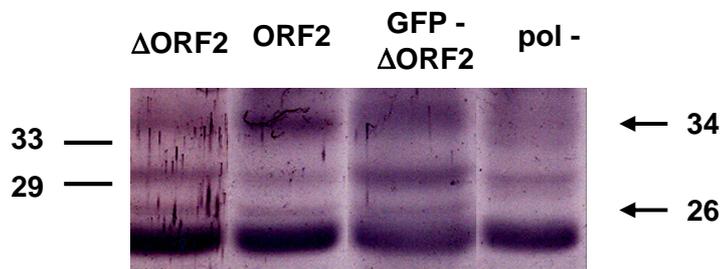


Figura 5.14: *Western blot* de la inmunoprecipitación de las VLPs de las tres construcciones pretratadas con tripsina. Para los anillos se obtuvo el mismo resultado.

5.4. DISCUSIÓN

Los resultados de este estudio han mostrado que la expresión del ORF2 del genoma de HAstV-1 en el sistema de expresión heteróloga basado en baculovirus recombinantes conduce a la formación de partículas *virus-like* (VLPs). Recientemente, también se había descrito la obtención de VLPs de astrovirus a partir de la expresión del ORF2 completo del HAstV-2 en el sistema de expresión basado en Vaccinia (Dalton y col., 2003).

Sin embargo, nuestro estudio también ha demostrado que los 70 primeros aminoácidos del extremo amino-terminal de la poliproteína de 87 kDa no son necesarios para el ensamblaje de la cápside, y que este fragmento puede ser sustituido por la proteína GFP sin verse alterada la producción de VLPs. Es este último caso se obtienen VLPs con autofluorescencia, característica que puede ser utilizada en futuros estudios como los realizados con GFP-VLPs de otros virus como rotavirus (Charpilienne y col., 2001; y Caballero y col., 2004).

Tras la expresión de las tres construcciones, las micrografías muestran que el tamaño de las VLPs fue en todos los casos de unos 38 nm de diámetro y con una superficie ligeramente rugosa. Clásicamente a los astrovirus se les había atribuido un diámetro de 28 nm con una superficie lisa (Madeley y Cosgrove, 1975), pero actualmente son varios los trabajos que hablan de un diámetro del virus entre 35 y 43 nm y de la presencia de unas espículas protuberantes que se extienden hacia el exterior desde la superficie del virus (Risco y col., 1995; y Matsui y Greenberg, 2001a). Nuestros resultados están más acordes con estos últimos trabajos.

En un principio, nuestros resultados no nos permiten afirmar con rotundidad cual de los modelos propuestos para el ensamblaje de la cápside de HAstV-1 es el correcto (Bass y Qiu, 2000; y Geigenmüller y col., 2002b) ya que ambas formas del ORF2, truncada y completa respectivamente, conducen a la formación de VLPs.

Sin embargo, los resultados obtenidos en la inmunoprecipitación de las VLPs tratadas con tripsina nos hacen pensar que el modelo correcto es el de Geigenmüller y col. Las proteínas de 34 kDa y 26 kDa obtenidas tras la expresión del ORF2 completo y tratamiento con tripsina son precisamente las proteínas que forman parte de la cápside del HAstV-1 maduro (Belliot y col., 1997a). Por el contrario, en el caso de la expresión del Δ ORF2, la presencia única de la proteína de 26 kDa lleva a una discordancia de resultados respecto a los mostrados por Belliot y col. (1997a) y por Bass y Qiu en su propio trabajo (2000), donde describen la obtención de proteínas de 34, 29 y 26 kDa a partir de la poliproteína de 79 kDa.

Entre las proteínas que forman las cápsides maduras de astrovirus, hay una de 29 kDa que en nuestros experimentos nunca se ha detectado. Sin embargo, esto puede ser explicado por los hechos que se trata de la proteína estructural minoritaria de las tres que forman parte de la cápside del virus (Belliot y col., 1997a; Dalton y col., 2003), y que es procesada por la tripsina para dar lugar a la de 26 kDa (Sánchez-Fauquier y col., 1994).

Previamente a nuestros estudios, ya se había descrito para algunos virus como calicivirus (Bertolotti-Ciarlet y col., 2002) y papillomavirus (El Mehdaoui y col., 2000) que el extremo amino-terminal de algunas proteínas estructurales no es necesario para el ensamblaje de las cápsides.

Concretamente para astrovirus, en el extremo amino-terminal de la poliproteína de 87 kDa nos encontramos con un elevado número de residuos básicos (Méndez-Toss y col., 2000) que pueden estar más relacionados con el empaquetamiento del genoma vírico que con el ensamblaje de las cápsides (Rao y Grantham, 1996; y Schmitz y Rao, 1998).

Recientemente, Geigenmüller y col. (2002b) construyeron una serie de mutantes de astrovirus con deleciones de hasta 50 aminoácidos del extremo amino-terminal de la poliproteína de la cápside y comprobaron que la infectividad de los virus disminuía hasta 1000 veces, lo que asociaron a la falta de empaquetamiento del genoma vírico. Nuestros resultados con la construcción Δ ORF2 no hacen más que reforzar las conclusiones de todos estos trabajos.

Uno de los resultados más interesantes de este estudio fue la descripción de unas estructuras en forma de anillo de 16 nm obtenidas tras la eliminación de los cationes divalentes presentes en la muestra. Estas estructuras podían ser interpretadas como capsómeros o como VLPs con simetría $T = 1$ tal y como se ha descrito para el virus de Norwalk (White y col., 1997).

La morfogénesis del virus de Norwalk ha sido ampliamente estudiada (Jiang y col., 1992; Prasad y col., 1994; y Bertolotti-Charlet y col., 2002). Su cápside está compuesta por una única proteína estructural de 60 kDa (Greenberg y col., 1981). La forma homodimérica de esta proteína, que puede adoptar diferentes orientaciones en el espacio, es la unidad estructural en el ensamblaje de la cápside.

Por el contrario, la morfogénesis de astrovirus está todavía por resolver. Los resultados obtenidos en este estudio muestran evidencias de que las estructuras en forma de anillo de 16 nm pueden ser un estadio intermedio en la morfogénesis del virus.

Una posibilidad, al igual que sucede con los picornavirus, es que estas estructuras sean capsómeros formados por protómeros con tres dominios β -barrel con una única orientación en el espacio correspondiente al correcto plegamiento de la proteína estructural, siendo imposible la formación de estructuras con simetría $T = 1$ por la falta de versatilidad espacial. Sin embargo, las predicciones de estructuras secundarias realizadas sobre la poliproteína de la cápside de astrovirus sólo muestran un dominio β -barrel localizado entre los aminoácidos 72 y 287 de la proteína VP34 del HAsV-1 (Acc. Nº L23513).

Por contrapartida, la falta de los tres dominios β -barrel abre la posibilidad de que estas estructuras en forma de anillo sean de VLPs con simetría $T = 1$. El dominio β -barrel, el cual alinea de forma significativa con la proteína VP2 del virus de la encefalomiелitis murina de Theiler (TMEV), un picornavirus, con la proteína pequeña de la cápside del virus de la vaina moteada de la alubia (BPMV), un comovirus, y con el dominio S de la proteína de la cápside del virus del clavel moteado (CMtV), un tombusvirus (Figura 5.15), no se ve afectado por la delección de los 70 aminoácidos de las construcciones Δ ORF2 y GFP Δ ORF2 permitiendo que el ensamblaje de VLPs aún sea factible. De todas formas, no cabe duda que serán necesarios estudios de análisis de estructura más profundos para aclarar este punto.

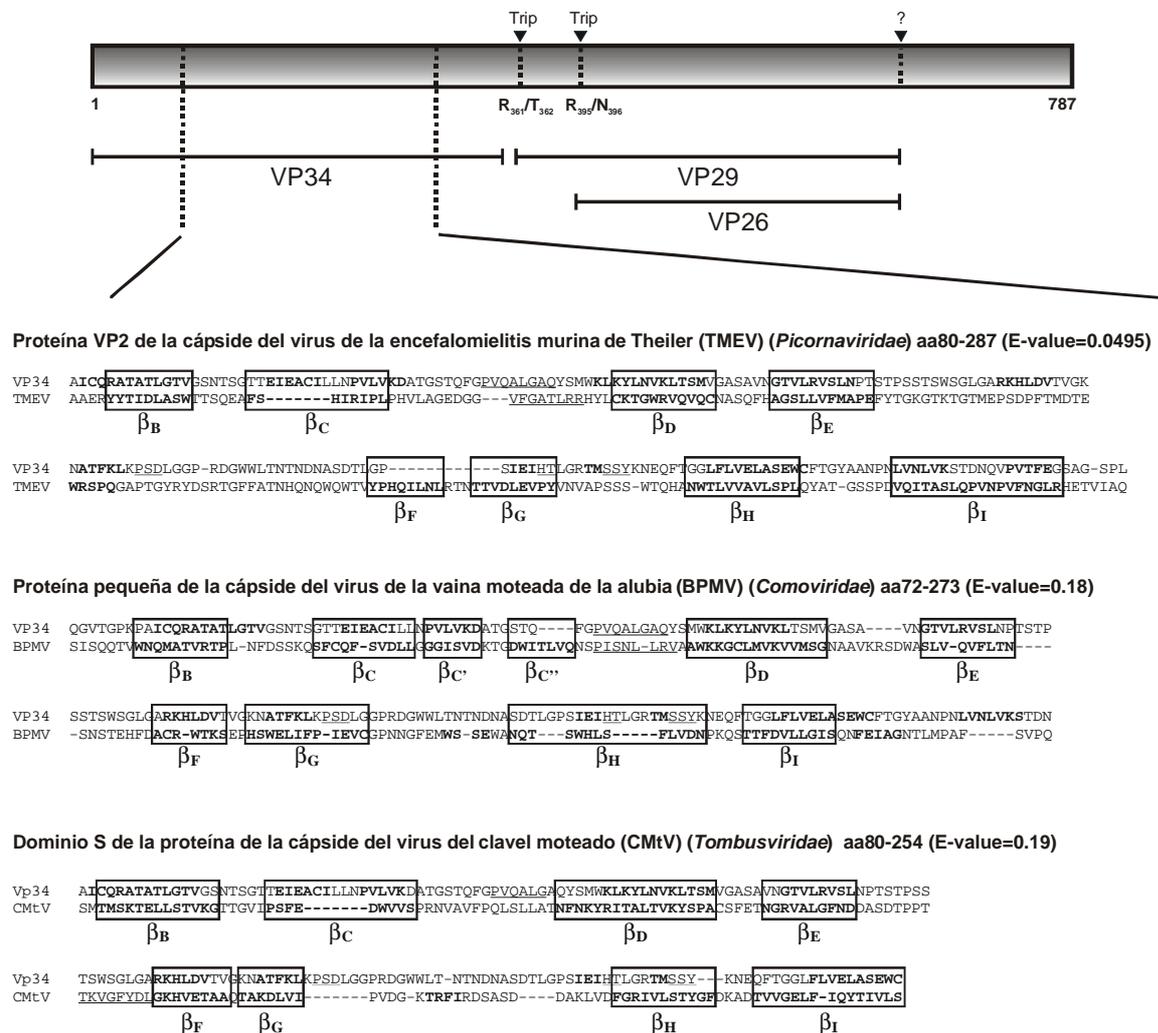


Figura 5.15: Representación esquemática del ORF2 de HAstV-1 (Acc. N°L23513). Las flechas negras indican los lugares de procesamiento proteolítico por tripsina (trip) o proteasas intracelulares (?). Los productos finales tras el procesamiento de la poliproteína se muestran como los cursores VP34, VP29 y VP26. Los dominios β -barrel precedidos dentro de VP34 de HAstV-1 y de los tres alineamientos significativos con otros virus (TMEV, BPMV y CMtV) están mostrados dentro de cuadros. Las secuencias marcadas en negrita corresponde a láminas beta y las secuencias subrayadas corresponden a hélices alfa.

La caracterización bioquímica para cada una de las construcciones reveló una composición proteica idéntica entre las VLPs y los anillos, y la misma susceptibilidad al procesamiento por la tripsina. La caracterización antigénica mostró unos niveles de reconocimiento por el anticuerpo monoclonal 8E7 similar para las VLPs y los anillos, mientras que las VLPs eran peor reconocidas que los anillos por el anticuerpo monoclonal 5B7. El epítipo definido para el MAb 8E7 se localiza entre los aminoácidos 71 y 260 de la proteína VP34, mientras que el epítipo definido para el MAb 5B7 se sitúa en la región común a las proteínas VP29 y VP26.

Estos datos sugieren que la proteína VP26 presenta una diferente conformación o menor accesibilidad para el MAb 5B7 en las VLPs respecto a los anillos.

Finalmente, otro de los puntos interesantes de este trabajo fue el estudio del papel de los iones divalentes en la estabilidad de las cápsides víricas.

Mientras que la utilización del agente quelante EDTA en la purificación de VLPs y astrovirus en gradientes de sacarosa prácticamente no afectaba a la estabilidad de éstos (Dalton y col., 2003 y Estudio I), cuando en los gradientes de CsCl se incluía EDTA, se observaba una total desestabilización de las VLPs hacia anillos y una completa pérdida de la infectividad en el caso del virus. De hecho, Matsui y Greenberg (2001a) ya habían descrito la necesidad de la adición de cationes divalentes en la purificación de astrovirus mediante gradientes isopícnicos de CsCl con el fin de estabilizar las partículas víricas.

El papel biológico de los iones divalentes en la estabilización de las VLPs y los astrovirus no está claro, pero no deja de ser sorprendente la necesidad de estos iones para el ensamblaje de las cápsides cuando sus concentraciones en el citoplasma de las células intestinales son muy bajas. Una explicación a estos hechos se puede buscar en el modelo de ensamblaje y desensamblaje de las cápsides de rotavirus. Para los rotavirus, tras la adsorción y penetración del virión en el interior de la célula, es necesario una baja concentración de iones Ca^{2+} para que tenga lugar el desensamblaje de la cápside y se libere el genoma vírico (Cohen y col., 1979). Por el contrario, una vez se forman las nuevas cápsides, el Ca^{2+} es necesario para la estabilización de éstas (Ruiz y col., 1996; y Gajardo y col., 1997); y al igual que pasa con las VLPs de HAstV-1 y con el propio HAstV-1, la presencia de quelantes de cationes divalentes como el EDTA o EGTA conduce a una desestabilización del cápside y una reducción de la infectividad de los rotavirus (Estes y col., 1979).

La observación de astrovirus en el interior de compartimentos membranosos intracelulares (Guix y col., 2004b) puede explicar que el virus, a la hora de producir la progenie vírica, busque este ambiente idóneo para su estabilización, ya que en estos compartimentos se forman microambientes con concentraciones de iones divalentes más elevadas que las presentes en el citoplasma. Sin embargo, cuando el virus infectase nuevas células, el genoma se desencapsidaría rápidamente debido a las bajas concentraciones de Ca^{2+} presentes en el citoplasma.

En resumen, con este estudio y gracias a la obtención de VLPs en grandes cantidades, se han abierto muchas puertas para futuros estudios de estructura y morfogénesis que permitan un mayor conocimiento de la biología básica de los astrovirus.

6. CONCLUSIONES

Conclusiones

Las conclusiones más relevantes derivadas de cada uno de los estudios fueron:

Estudio I:

La técnica de la RT-PCR competitiva permite la cuantificación fidedigna de la carga vírica presente en una muestra. Su aplicación en un estudio epidemiológico nos conducen a las siguientes conclusiones:

- La carga vírica en heces de niños con gastroenteritis causada por astrovirus alcanza un valor medio de 3.4×10^{10} genomas/g ($10.53 \log_{10}$), con una carga mínima y máxima de 10^8 y 10^{13} genomas por gramo de heces respectivamente.
- Existe una relación directa entre los niveles de virus excretados y el serotipo y/o genotipo del virus causante de la infección. En las infecciones causadas por el serotipo 3 (según la secuencia del ORF2) y genotipos IV y V (según la secuencia de la región hipervariable del ORF1a), los niveles de carga vírica son significativamente superiores al resto de serotipos y genotipos.
- Del mismo modo, parece existir una relación directa entre el serotipo 3, genotipo IV, de astrovirus y la persistencia de la gastroenteritis más allá del periodo considerado normal para una infección causada por este virus.

Estudio II

La variabilidad genética de la proteína nsP1a/4 entre los diferentes genotipos de astrovirus está directamente relacionada con la replicación del ARN vírico y con los niveles en la producción de progenie vírica.

Los experimentos con los diferentes HAstV-1 recombinantes en la zona codificante para la proteína nsP1a/4 nos permiten concluir que:

- A pesar de que la síntesis de ARN total de polaridad positiva es igual para los diferentes genotipos del virus, la relación ARN genómico : ARN subgenómico es inversa entre el genotipo VI y los genotipos IV y V, sintetizando estos últimos más ARN subgenómico que genómico.
- Los niveles en la producción de progenie vírica de los genotipos IV o V son significativamente superiores a los del genotipo VI.
- Las principales diferencias entre las secuencias aminoacídicas de las proteínas nsP1a/4 de los genotipos estudiados se encuentran en la región hipervariable y se centran en el número de residuos fosforilables. En base los resultados obtenidos y a la similitud con la proteína nsP3 de alphavirus, parece existir una relación directa entre la fosforilación de la proteína nsP1a/4 y la regulación de síntesis de ARN víricos de astrovirus.

Estudio III: La obtención de partículas “virus-like” (VLPs) de astrovirus y la utilización de diferentes metodologías en su purificación nos permiten concluir que:

- La expresión del ORF2 de astrovirus en el sistema de expresión heteróloga basado en baculovirus recombinantes da lugar a la poliproteína de 87 kDa que se ensambla obteniéndose VLPs de 38 nm de diámetro.
- El extremo amino (70 aa) de la poliproteína no es imprescindible para la formación de VLPs, y puede ser sustituido por otra secuencia proteica dando lugar a VLPs portadoras de moléculas trazadoras, en nuestro caso GFP-VLPs.

- La utilización de gradientes de sacarosa en la purificación de VLPs permite diferenciar entre tres estados morfogénicos en el proceso de ensamblaje de la cápside vírica: proteína no estructurada (1.05 g/ml), anillos de 16 nm (1.08 g/ml) y cápsides víricas (1.12 g/ml). En el caso del virus, la aparición de un estado morfogénico con densidad 1.14 g/ml se asocia con el virus infeccioso (con ácido nucleico).
- La adición de agentes quelantes de iones divalentes en la purificación de las VLPs en gradientes de CsCl provoca la desestabilización de las cápsides víricas dando lugar a proteína soluble y anillos de 16 nm. En el caso del virus, este hecho produce la pérdida total de infectividad. La desestabilización de las VLPs en anillos de 16 nm es un fenómeno reversible si se elimina el agente quelante y se añaden iones divalentes.
- A pesar de que la composición proteica de las VLPs y los anillos de 16 nm es la misma, presentan propiedades antigénicas distintas.

7. APÉNDICE I:

MATERIAL Y MÉTODOS

7.1. LÍNEAS CELULARES Y VIRUS

7.1.1. Líneas Celulares

CaCo-2:

La línea celular continua CaCo-2 (ATCC HBT 37) empleada para la propagación de astrovirus tiene su origen en un adenocarcinoma de colon humano. Las células se cultivaban a 37 °C en medio mínimo esencial (MEM) de Eagle con sales de Earle (ICN) suplementado con un 10 % de suero fetal bovino (SFB) (Biowhittaker), aminoácidos, antibióticos y soluciones tamponadoras de pH (HEPES y bicarbonato sódico). La línea celular era subcultivada tras formar monocapa confluyente mediante tripsinización según protocolos clásicos de cultivo celular y sembradas con una relación de multiplicación de 1:3. Las células volvían a formar una monocapa confluyente tras 3-4 días de incubación a 37 °C.

BHK-21:

La línea celular continua BHK-21 (ATCC CCL-10) empleada para la obtención de astrovirus recombinantes mediante transfección del ARN vírico por electroporación tiene su origen en riñón de hámster recién nacido (del inglés *Baby Hamster Kidney*). Las células se cultivaban a 37 °C en medio mínimo esencial (MEM) de Eagle con sales de Earle (ICN) suplementado con un 10 % de suero fetal bovino (SFB) (Biowhittaker), aminoácidos, antibióticos, soluciones tamponadoras de pH (HEPES y bicarbonato sódico) y piruvato sódico a una concentración final de 1 mM. La línea celular era subcultivada al formar monocapa confluyente mediante tripsinización según protocolos clásicos de cultivo celular y sembradas

con una relación de multiplicación de 1:8. Las células volvían a formar monocapa confluyente tras 2-3 días de incubación a 37 °C.

Sf9:

La línea celular continua (ATCC CLR 1711) empleada para la propagación de baculovirus tiene su origen en células epiteliales de la larva de la mariposa *Spodoptera frugiperda*. Las células se cultivaban a 28 °C en medio TC-100 (Invitrogen) suplementado con antibióticos y un 10 % suero fetal bovino (Biowhittaker) inactivado por tratamiento térmico durante 30 min a 56 °C (SFBi). La línea celular era subcultivada cada 3-4 días mediante dilución del cultivo en medio fresco cuando el cultivo alcanzaba una densidad celular de 2×10^6 células por mililitro, dejando el cultivo a una densidad de 2×10^5 células por mililitro. El conteo de células viables se realizaba en una cámara de Neubauer por exclusión de las células teñidas tras añadir a una alícuota del cultivo una décima parte del colorante azul de tripano 0.4% (Sigma).

• **Medios de cultivo y soluciones necesarias:**

MEM + 10 % SFB: MEM 1X en H₂O_{bd} con sales de Earle autoclavado 15 min suplementado en condiciones de esterilidad con:

SFB.....	10 % (v/v)
L-Glutamina.....	2 mM
Aminoácidos no esenciales (100X).....	1X
HEPES.....	15 mM
Bicarbonato sódico 7.5 % (p/v).....	2 % (v/v)
Penicilina / Estreptomina.....	100 UI/ml – 100 µg/ml

Conservar a 4°C.

Tampón PBS:

NaCl.....	8 g/l
KCl.....	0.2 g/l
Na ₂ HPO ₄	1.15 g/l
KH ₂ PO ₄	0.2 g/l

H₂O_{bd}
pH 7.2
Esterilizar por autoclave 15 min.
Conservar a 4 °C.

Tripsina-EDTA: Tripsina 1:250 (Difco)..... 0.25 % (p/v)
 EDTA..... 0.5 mM
 Penicilina / Estreptomicina..... 100 UI/ml – 100 µg/ml
 Tampón PBS
 pH 7.2
 Esterilizar por filtración por 0.22 µm antes de añadir los antibióticos.
 Conservar a –20 °C.

TC-100 + 10 % SFBi: TC-100 1X en H₂O_{bd} filtrado por 0.22 µm por presión
 positiva y suplementado en condiciones de esterilidad con:
 SFBi..... 10 % (v/v)
 Penicilina / Estreptomicina..... 100 UI/ml – 100 µg/ml
 Conservar a 4 °C.

7.1.2. Virus

Astrovirus

La cepa de astrovirus humano serotipo 1 (HAstV-1) utilizada en diferentes apartados de este trabajo corresponde a una cepa aislada de muestras fecales cedida amablemente por M. Koopmans del RIVM en Bilthoven (Holanda).

La cepa de astrovirus humano serotipo 4 (HAstV-4) utilizada en diferentes apartados de este trabajo es la cepa p23795 y corresponde a un aislado de muestras fecales procedente de Gran Bretaña y amablemente cedida por W.D. Cubitt del Great Ormond Street Hospital for Sick Children de Londres.

Baculovirus

La cepa AcNPVRP8 de baculovirus, que se caracteriza por no expresar la proteína de la poliedrina, utilizada en diferentes apartados de este estudio como control negativo de expresión proteica fue cedida por R. D. Possee del NERC Institute of Virology de Oxford.

7.2. INFECCIONES VÍRICAS

7.2.1. Astrovirus

La propagación de astrovirus en la línea celular CaCo-2 se realizaba basándonos en el protocolo descrito por Pintó y col. (1994) tal y como se describe a continuación:

1. Pretratar el inóculo vírico con 10 µg/ml de tripsina GIX (Sigma) durante 30 min a 37 °C.
2. Decantar el medio de crecimiento de la línea celular CaCo-2 y lavar dos veces la monocapa con tampón PBS para eliminar restos de suero fetal del medio.
3. Añadir el inóculo vírico a la monocapa celular e incubar 1 h a 37 °C para favorecer la adsorción del virus a las células.
4. Añadir MEM 0% SFB suplementado con 5 µg/ml de tripsina GIX.
5. Incubar las células infectadas durante 3-4 días a 37 °C.
6. Tras la infección, la obtención de la suspensión vírica se puede realizar de dos formas:
 - a.- *Suspensión vírica clarificada*: Se trata de una suspensión vírica que se obtiene a partir del medio de cultivo tras romper las células por congelación / descongelación. Se caracteriza por tener un título infeccioso medio pero escasa carga de restos celulares. Dicha suspensión se obtiene del siguiente modo:
 - a.1.- Lisar las células mediante 3 ciclos de congelación a -80 °C y descongelación a temperatura ambiente.
 - a.2.- Eliminar los restos celulares por centrifugación durante 10 min a 3000 g recuperando el sobrenadante resultante.
 - a.3.- Conservar las suspensiones víricas a -80 °C.
 - b.- *Suspensión vírica concentrada*: Se trata de una suspensión vírica que se obtiene a partir de las células tras concentración por centrifugación y lisis por tratamiento con un detergente no iónico. Se caracteriza por presentar un título vírico infeccioso elevado aunque tiene una elevada carga de restos celulares. Dicha suspensión se obtiene del siguiente modo:
 - b.1.- Centrifugar las células durante 15 min a 1000 g.
 - b.2.- Resuspender el precipitado celular en tampón de lisis celular (tampón TN o TNE + 1% *Nonidet P-40* (Fluka)) de manera que la concentración de células fuera de 1×10^7 células por ml.
 - b.3.- Incubar durante 30 - 60 min a temperatura ambiente en agitación.
 - b.4.- Centrifugar la suspensión vírica 5 min a 3000 g para eliminar los núcleos y restos celulares de gran tamaño.

b.5- Centrifugar el sobrenadante resultante 5 min a 14000 g para eliminar los restos celulares de pequeño tamaño.

b.6- Recuperar el sobrenadante resultante y conservar las suspensiones víricas a -80 °C.

7.2.2. Baculovirus

La propagación de baculovirus en la línea celular Sf9 se podía realizar siguiendo dos protocolos distintos dependiendo si las células se hacían crecer en suspensión o adheridas al soporte plástico:

1.- Células en suspensión:

- a. 1×10^8 células eran centrifugadas a 1000 g durante 10 min, y el precipitado celular era resuspendido en 10 ml de inóculo vírico diluido en medio TC-100 a una multiplicidad de infección (m.o.i.) de 0.1.
- b. Las células en contacto con el virus eran incubadas durante 1 h a temperatura ambiente para favorecer la adsorción del virus a las células.
- c. Tras el periodo de adsorción, las células eran diluidas en medio TC-100 + 10% SFBi a una densidad final de 1×10^6 células por mililitro (volumen final del cultivo de 100 ml) e incubadas durante 5-6 días a 28 °C.
- d. Al sexto día, las células eran centrifugadas durante 15 min a 1000 g recuperando el sobrenadante donde se encontraban los baculovirus.
- e. Finalmente, la carga vírica de las suspensiones era determinada mediante ensayo en placa tal y como se detalla más adelante.

2.- Células adheridas al soporte plástico:

- a. 1.2×10^7 células eran sembradas en un frasco de 175 cm² de superficie, y se dejaba que sedimentaran durante 1 h a temperatura ambiente.
- b. Cuando las células estaban adheridas al plástico, se descartaba el medio y se añadía el inóculo vírico diluido en medio TC-100 a una m.o.i. de 0.1 en un volumen final de 6 mililitros permitiendo el contacto del virus con las células durante 1 h a temperatura ambiente.
- c. Tras el periodo de adsorción, el inóculo era descartado y se añadían 30 ml de TC-100 + 10% SFBi incubando las células durante 5-6 días a 28 °C.
- d. Al sexto día, las células eran centrifugadas durante 15 min a 1000 g recuperando el sobrenadante donde se encontraban los baculovirus.

- e. Finalmente, la carga vírica de las suspensiones era determinada mediante ensayo en placa tal y como se detalla más adelante.

La determinación de la carga vírica de las suspensiones de baculovirus obtenidas se realizaba por ensayo en placa tal y como se detalla a continuación:

- a. Una placa de 6 pocillos era sembrada con 1×10^6 células por pocillo dejando que las células sedimentasen durante 1 h a temperatura ambiente.
- b. Pasada la hora de sedimentación, se descartaba el medio de cultivo y la suspensión vírica era diluida siguiendo una serie dilucional 1/10 en medio TC-100, añadiendo a cada uno de los pocillos 0.5 ml de una de las diluciones.
- c. La placa era incubada durante 1 h a temperatura ambiente para favorecer la adsorción del virus.
- d. Pasada la hora de adsorción, se descartaba el inóculo vírico y se añadía a cada pocillo 3 ml de medio TC-100 + 10 % SFBi + 1% Agarosa.
- e. Tras dejar solidificar el medio a temperatura ambiente, la placa era incubada en una atmósfera húmeda a 28 °C durante 5-6 días.
- f. Al sexto día, a cada pocillo se le añadía 1 ml de rojo neutro al 0.1% diluido en TC-100 y se incubaba durante 1 h a 28 °C en una atmósfera húmeda.
- g. Finalizada la hora de incubación, se descartaba el exceso de rojo neutro y se incubaba la placa invertida durante 12 h a 28 °C en una atmósfera húmeda.
- h. A las 12 h, se contaban las calvas de lisis de aquellas diluciones en las que el número de calvas estuviese entre 10 y 100.
- i. Para definir la carga vírica de la suspensión titulada, se multiplicaba el número de calvas contadas por el inverso de la dilución evaluada y se dividía por el volumen inoculado, obtenido un valor expresado en unidades formadoras de calvas por mililitro (UFC/ml).

- **Medios de cultivo y soluciones necesarias:**

Tripsina GIX (1 mg/ml): Tripsina GIX (Sigma).....10 mg
Tampón PBS..... 10 ml
Esterilizar por filtración por 0.22 µm.
Conservar a -20 °C.

- MEM:** MEM 1X en H₂O_{bd} con sales de Earle autoclavado 15 min suplementado en condiciones de esterilidad con:
- | | |
|---------------------------------------|-----------------------|
| L-Glutamina..... | 2 mM |
| Aminoácidos no esenciales (100X)..... | 1X |
| HEPES..... | 15 mM |
| Bicarbonato sódico 7.5 % (p/v)..... | 2% (v/v) |
| Penicilina / Estreptomicina..... | 100 UI/ml – 100 µg/ml |
- Conservar a 4°C.*
- Tampón TN:**
- | | |
|---------------|--------|
| Tris-HCl..... | 50 mM |
| NaCl..... | 100 mM |
- H₂O_{bd}
pH 7.4
Esterilizar por autoclave 15 min.
Conservar a 4°C.
- Tampón TNE:**
- | | |
|---------------|--------|
| Tris-HCl..... | 50 mM |
| NaCl..... | 100 mM |
| EDTA..... | 10 mM |
- H₂O_{bd}
pH 7.4
Esterilizar por autoclave 15 min.
Conservar a 4°C.
- TC-100 + 10 % SFBi:** TC-100 1X en H₂O_{bd} filtrado por 0.22 µm por presión positiva y suplementado en condiciones de esterilidad con:
- | | |
|----------------------------------|-----------------------|
| SFBi..... | 10 % (v/v) |
| Penicilina / Estreptomicina..... | 100 UI/ml – 100 µg/ml |
- Conservar a 4°C.*
- TC-100 + 10 % SFBi + 1% Agarosa:**
- | | |
|-----------------------------------------|-----------------------|
| TC-100 + 10 % SFBi..... | 66 % (v/v) |
| Agarosa bajo punto de fusión al 3%..... | 33 % (v/v) (1% final) |
- Preparación y uso inmediato.*

Rojo neutro 1 %: Rojo neutro1 g
 H₂O_{bd}..... 100 ml
 Esterilizar por autoclave 15 min.
 Conservar a 4°C.

7.3. ENSAYO INMUNOENZIMÁTICO (E.L.I.S.A.) DE CAPTURA

La detección de proteína vírica de la cápside de astrovirus se llevaba a cabo mediante un ensayo inmunoenzimático de captura descrito previamente por Herrmann y col. (1990). Se utilizaban microplacas de poliestireno de 96 pocillos (Sarsted) y se seguía el protocolo que se detalla a continuación:

1. Recubrir los pocillos de las microplacas con 50 µl de tampón de recubrimiento con la dilución 1:10000 del MAb 8E7 e incubar 12 h a 4 °C.
2. Lavar tres veces con 100 µl/pocillo de solución de lavado.
3. Bloquear la placa con 100 µl/pocillo de solución de bloqueo e incubar 30 min a 37 °C.
4. Repetir paso 2.
5. Añadir 50 µl/pocillo de la muestra a analizar e incubar 2 h a 37 °C.
6. Repetir paso 2.
7. Añadir 50 µl/pocillo de solución de lavado con la dilución 1:5000 del anticuerpo policlonal de conejo anti-HAstV-1 e incubar 2 h a 37 °C.
8. Repetir paso 2.
9. Añadir 50 µl/pocillo de solución de lavado con la dilución 1:5000 del anticuerpo policlonal de cabra anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa e incubar 1 h 30 min a 37 °C.
10. Repetir paso 2.
11. Añadir 100 µl/pocillo de solución de revelado e incubar 15 min a 37 °C.
12. Parar la reacción cromogénica con 25 µl/pocillo de H₂SO₄ 1M.
13. Leer la absorbancia a $\lambda = 492$ nm con un lector automático (*Multiskan Plus* (Labsystem)).

• **Soluciones necesarias:**

Tampón de recubrimiento: NaCO₃..... 15 mM
 NaHCO₃.....35 mM
 H₂O_{bd}
 pH 9.6
 Conservar a 4°C.

<i>Solución de lavado:</i>	Tampón PBS Tween 20 (Fluka) 0.3% (v/v) <i>Preparación y uso inmediato.</i>
<i>Solución de bloqueo:</i>	Tampón PBS Albúmina sérica bovina (Sigma) 1% (p/v) Tween 20 (Fluka) 0.3% (v/v) <i>Preparación y uso inmediato.</i>
<i>Solución de revelado:</i>	Citrato sódico..... 30 mM Ácido cítrico..... 20 mM OPD (1,2-fenilendiamina)..... 4 mM H ₂ O ₂ 30%..... 0.1% (v/v) H ₂ O _{bd} <i>Preparación y uso inmediato.</i>

7.4. EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

La extracción de ácidos nucleicos de cualquier tipo de muestra se llevaba a cabo en un ambiente libre de ribonucleasas siguiendo el protocolo descrito previamente por Boom y col. (1990) tal y como se detalla a continuación:

1. Dispensar en un microtubo 900 µl de tampón de lisis L6, 40 µl de solución de sílice y 50 µl de muestra.
2. Mezclar por agitación e incubar 10 min a temperatura ambiente.
3. Centrifugar 15 sec a 14000 g.
4. Resuspender el precipitado en 800 µl de tampón de lisis L2.
5. Mezclar por agitación y centrifugar 15 sec a 14000 g.
6. Repetir pasos 4 y 5.
7. Resuspender el precipitado en 800 µl de etanol 70%.
8. Mezclar por agitación y centrifugar 15 sec a 14000 g.
9. Repetir pasos 7 y 8.
10. Resuspender el precipitado en 800 µl de acetona.
11. Mezclar por agitación y centrifugar 15 sec a 14000 g.
12. Descartar el sobrenadante y secar el precipitado 10 min a 56 °C manteniendo el tubo abierto.

13. Añadir 50 µl de tampón de elución TE, mezclar por agitación e incubar 10 min a 56 °C manteniendo el tubo cerrado.
14. Centrifugar 5 min a 14000 g y recuperar el sobrenadante con cuidado de no contaminarlo con sílice.
15. Guardar los ácidos nucleicos a -80 °C hasta su utilización.

• **Soluciones necesarias:**

Tampón Tris-HCl 0.1 M: Tris-HCl..... 12.11 g
H₂O_{bd}..... 1 l
Esterilizar por autoclave 45 min.
Conservar a temperatura ambiente.

Solución EDTA 0.2 M: EDTA · 2 H₂O..... 7.44 g
H₂O_{bd}..... 100 ml
pH 8.0
Esterilizar por autoclave 45 min.
Conservar a temperatura ambiente.

Tampón de lisis L2: Tiocianato de guanidina..... 120 g
Tampón Tris-HCl 0.1 M..... 100 ml
Disolver en un baño a 65 °C.
Conservar a temperatura ambiente protegido de la luz.

Tampón de lisis L6: Tampón de lisis L2..... 100 ml
Solución EDTA 0.2 M..... 11 ml
Tritón X-100..... 1.22 ml
Conservar a temperatura ambiente protegido de la luz.

Tampón de elución TE: Tris-HCl..... 10 mM
EDTA..... 1 mM
H₂O_{bd}
pH 8.0
Esterilizar por autoclave 45 min.
Conservar a temperatura ambiente.

Solución de sílice: Disolver 60 g de SiO₂ en 500 ml de H₂O_{bd}. Dejar sedimentar durante 24 h a temperatura ambiente. Descartar 430 ml del sobrenadante y resuspender el sedimento en 500 ml de H₂O_{bd}. Dejar sedimentar durante 5 h a temperatura ambiente. Descartar 450 ml del sobrenadante y añadir 0.6 ml de HCl 32%.
Conservar a temperatura ambiente protegido de la luz.

7.5. DOT BLOTE HIBRIDACIÓN MOLECULAR DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Una vez realizada la extracción de ácidos nucleicos de la muestra, los ARN víricos eran fijados (*dot blot*) a una membrana de nylon cargada positivamente (Roche). La detección de los genomas de astrovirus eran realizada mediante hibridación molecular con una sonda de ADNc marcada con digoxigenina específica de un fragmento del ORF2 del genoma de astrovirus obtenida a partir del ARN de la cepa p23795 de HAstV-4 mediante la RT-PCR descrita por Noel y col. (1995). En esta RT-PCR se utilizaron los cebadores Mon244 y Mon245, dATPs marcados con digoxigenina y las enzimas *M-MLV RT* y *Taq DNA Polymerase*.

El protocolo seguido era el siguiente:

7.5.1. Dot blot

1. Empapar durante 10 min la membrana de nylon en H₂O_{bd} autoclavada 45 min.
2. Colocar la membrana humedecida en el *cassette* de *dot blot* y conectarlo a una bomba de vacío.
3. Incubar los ácidos nucleicos extraídos 3 min a 100 °C e inmediatamente colocarlos en hielo durante 5 min.
4. Encender la bomba de vacío, añadir las muestras de ácidos nucleicos extraídos a los pocillos del *cassette* (una muestra por pocillo) y dejar que el líquido sea absorbido por la bomba.
5. Desconectar la bomba y recuperar la membrana de nylon de dentro del *cassette*.
6. Fijar los ácidos nucleicos por irradiación de 3 min bajo luz UV seguida de 20 min a 120 °C en un horno de vacío.

7.5.2. Hibridación molecular de ácidos nucleicos

1. Incubar la membrana con solución de prehibridación 2 h a 42 °C.
2. Descartar la solución de prehibridación e incubar 12 h a 42 °C con la solución de hibridación.
3. Lavar la membrana con solución SSC 2X + 0.1% SDS, 15 min a temperatura ambiente.
4. Lavar la membrana con solución SSC 0.5X + 0.1% SDS, 15 min a temperatura ambiente.
5. Lavar la membrana con solución SSC 0.5X + 0.1% SDS, 15 min a 47 °C.
6. Bloquear la membrana con tampón de bloqueo, 30 min a temperatura ambiente.
7. Incubar la membrana con el anticuerpo anti-digoxigenina (Roche) diluido 1:10000 en tampón de bloqueo, 30 min a temperatura ambiente.
8. Lavar la membrana dos veces con tampón I + 0.3% Tween 20, 15 min cada vez.
9. Lavar la membrana con tampón de revelado, 5 min.
10. Revelados de la membrana:
 - 10.1. Revelado quimioluminiscente:
 - 10.1.1. Añadir 500 µl del sustrato quimioluminiscente CSPD® diluido 1:100 en tampón de revelado por cada 10 cm² de membrana.
 - 10.1.2. Incubar 5 min a temperatura ambiente y luego 15 min más a 37 °C oscuridad.
 - 10.1.3. Colocar un film de rayos X y la membrana dentro de un *cassette* de revelado y realizar una exposición de 1 h.
 - 10.1.4. Revelar el film.
 - 10.2. Revelado cromogénico:
 - 10.2.1. Sumergir la membrana en 10 ml de tampón de revelado suplementado con 45 µl NBT (Roche) y 35 µl BCIP/X-Phosphate (Roche) y mantener en oscuridad hasta que precipite el sustrato.

- **Soluciones necesarias:**

Tampón SSC 20X:

NaCl.....	3 M
Citrato trisódico	0.3 M
H ₂ O _{bd}	
<i>pH 7.0</i>	
<i>Esterilizar por autoclave 15 min.</i>	
<i>Conservar a 4 °C.</i>	

<i>Solución estándar:</i>	Tampón SSC 20X.....25 ml SDS 10%.....0.2 ml <i>Blocking Reagent</i> (Roche).....1 g N-laurosilsarcosina.....0.1 g H ₂ O _{bd} 75 ml <i>Conservar a -20 °C.</i>
<i>Solución de prehibridación:</i>	Formamida desionizada..... 50 ml Solución estándar.....50 ml ADN esperma de arenque.....0.1 mg/ml <i>Conservar a -20 °C.</i>
<i>Solución de hibridación:</i>	Sonda..... 50 ng/ml Solución de prehibridación <i>Conservar a -20 °C.</i>
<i>Solución SSC 2X:</i>	Tampón SSC 20 X.....10 ml H ₂ O _{bd} 90 ml <i>Preparación y uso inmediato.</i>
<i>Solución SSC 0.5X:</i>	Tampón SSC 20 X.....2.5 ml H ₂ O _{bd} 97.5 ml <i>Preparación y uso inmediato.</i>
<i>Tampón I:</i>	NaCl.....150 mM Ácido maleico..... 100 mM Tween 20.....0.3% (v/v) H ₂ O _{bd} <i>pH 7.5</i> <i>Esterilizar por autoclave 15 min.</i> <i>Conservar a 4 °C.</i>
<i>Tampón de bloqueo:</i>	Tampón I..... 500 ml <i>Blocking Reagent</i> (Roche)..... 5 g <i>Esterilizar por autoclave 15 min.</i> <i>Conservar a 4 °C.</i>

Tampón de revelado: Tris-HCl..... 100 mM
NaCl.....100 mM
pH 9.5
Esterilizar por autoclave 15 min.
Conservar a 4 °C.

7.6. RT-PCR

Las enzimas utilizadas para las retrotranscripciones fueron la *M-MLV Reverse Transcriptase* (Promega), la cual es una versión modificada de la transcriptasa reversa del *Moloney Murine Leukaemia Virus* a la que se ha mutado su actividad RNasa H, y la *Expand RT* (Roche). Para las PCR se utilizaron la *Pwo DNA Polymerase* (Roche), una forma recombinante de la ADN polimerasa de *Pyrococcus woesei* y la *Expand High Fidelity PCR System* (Roche), la cual consiste en una mezcla de *Pwo DNA Polymerase* (Roche) y *Taq DNA Polymerase* (Roche). Las condiciones de trabajo eran las siguientes:

RT:

Con la enzima *M-MLV Reverse Transcriptase* (Promega):

1. Desnaturalizar 5 µl de muestra o dilución de ésta durante 5 min a 99 °C e inmediatamente poner en hielo.
2. Preparar la mezcla de reacción de RT para cada muestra o dilución según las siguientes proporciones:

§	Tampón <i>M-MLV RT</i> 5X.....	2 µl
§	dNTP 2 mM.....	1 µl
§	Cebador 100 µM.....	1 µl
§	H ₂ O _{bd} esterilizada por autoclave 45'.....	0.86 µl
§	Inhibidor de ribonucleasas <i>RNasin</i> ® 30 U/µl.....	0.1 µl
§	<i>M-MLV RT</i> (200 U/µl).....	<u>0.04 µl</u>
		5 µl

3. Añadir la muestra o su correspondiente dilución a la mezcla de reacción de RT, incubar durante 1 h a 42 °C para sintetizar el ADNc y colocar en hielo inmediatamente.

Con la enzima *Expand Reverse Transcriptase* (Roche):

1. Desnaturalizar 5 μ l de muestra o dilución de ésta durante 5 min a 99 °C e inmediatamente poner en hielo.
2. Preparar la mezcla de reacción de RT para cada muestra o dilución según las siguientes proporciones:

§	Tampón <i>Expand RT 5X</i>	2 μ l
§	dNTP 2 mM.....	1 μ l
§	DTT 100mM.....	1 μ l
§	Cebador 100 μ M.....	0.2 μ l
§	H ₂ O _{bd} esterilizada por autoclave 45'.....	0.6 μ l
§	Inhibidor de ribonucleasas <i>RNasin®</i> 30 U/ μ l.....	0.1 μ l
§	<i>M-MLV RT</i> (200 U/ μ l).....	<u>0.1 μl</u>
		5 μ l

3. Añadir la muestra o su correspondiente dilución a la mezcla de reacción de RT, incubar durante 1 h a 42 °C para sintetizar el ADNc y colocar en hielo inmediatamente.

PCR:Con la enzima *Expand High Fidelity PCR System* (Roche):

1. Preparar la mezcla de reacción de PCR para cada muestra según las siguientes proporciones:

§	Tampón <i>Expand HiFi PCR System 10X</i>	5 μ l
§	dNTP 2 mM.....	5 μ l
§	Cebador 100 μ M.....	0.5 μ l
§	Cebador 100 μ M.....	0.5 μ l
§	MgCl ₂ 25 mM.....	4 μ l
§	H ₂ O _{bd} esterilizada por autoclave 45'.....	24.85 μ l
§	<i>Expand HiFi PCR System</i> (3.5 U/ μ l).....	<u>0.15 μl</u>
		40 μ l

2. Añadir el producto de RT a la mezcla de reacción de PCR.
3. Realizar el programa específico de PCR y analizar el resultado por electroforesis.

Con la enzima *Pwo DNA Polymerase* (Roche):

1. Preparar la mezcla de reacción de PCR para cada muestra según las siguientes proporciones:

§	Tampón <i>Pwo DNA Polymerase</i> 10X.....	5 µl
§	dNTP 2 mM.....	5 µl
§	Cebador 100 µM.....	0.5 µl
§	Cebador 100 µM.....	0.5 µl
§	MgSO ₄ 25 mM.....	4 µl
§	H ₂ O _{bd} esterilizada por autoclave 45'.....	24.9 µl
§	<i>Pwo DNA Polymerase</i> (5 U/µl).....	<u>0.1 µl</u>
		40 µl

2. Añadir el producto de RT a la mezcla de reacción de PCR.
3. Realizar el programa específico de PCR y analizar el resultado por electroforesis.

7.7. ELECTROFORESIS DE ADN

Los geles de agarosa se preparaban utilizando *SeaKem® LE Agarose* (Cambrex) en tampón TBE 1X a la concentración deseada. Normalmente, en cada pocillo se analizaban 10 µl de muestra mezclados con 2 µl de tampón de carga 6X. La electroforesis se realizaba a una velocidad constante de 70 V.

Los geles de poliacrilamida se preparaban utilizando poliacrilamida 30% en tampón TBE 1X a la concentración deseada añadiendo como agentes polimerizantes el persulfato amónico al 10% (APS 10%) y el N,N,N',N'-tetrametil-etilendiamina (TEMED). Para estos geles de tamaño 7 cm x 8 cm x 0.75 mm se utilizaron las cubetas *Mini Protean®II* (Bio-Rad) y los peines para 10 muestras. Para la preparación de cada gel se utilizaban 5 ml de solución polimerizante siguiendo las siguientes proporciones:

<i>Solución polimerizante:</i>	Acrilamida 30%.....	1.5 ml
	TBE 10X.....	0.5 ml
	H ₂ O _{bd}	3 ml
	APS 10%.....	50 µl
	TEMED.....	5 µl

Normalmente, en cada pocillo se analizaban 20 µl de muestra mezclados con 4 µl de tampón de carga 6X. La electroforesis se realizaba a una velocidad constante de 120 V.

En ambos casos, tras la electroforesis los geles eran teñidos en una cubeta con tampón TBE 1X y bromuro de etidio a una concentración de 0.5 µg/ml durante 30 min. La fotografía del gel se realizaba utilizando un transiluminador *ImageMaster*[®] VDS (Pharmacia Biotech).

- **Soluciones necesarias:**

Tampón TBE 10X:

Tris- HCl.....	108 g/l
Ácido bórico.....	55 g/l
EDTA.....	0.05 M
H ₂ O _{bd}	
<i>pH 8.0</i>	
<i>Esterilizar por autoclave 15 min.</i>	
<i>Conservar a temperatura ambiente.</i>	

Tampón de carga 6X:

Glicerol.....	30% (v/v)
Azul de bromofenol.....	0.25% (p/v)
Tampón TBE 10X.....	10% (v/v)
H ₂ O _{bd}	
<i>Conservar a 4 °C.</i>	

Acilamida 30%:

Acilamida.....	29 g
N,N'-bis-metilen-acilamida.....	1 g
H ₂ O _{bd} hasta 100 ml totales	
<i>Disolver a 37 °C.</i>	
<i>Conservar a 4 °C protegido de la luz.</i>	

7.8. SECUENCIACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Para analizar la secuencia de los productos de ADN obtenidos por RT-PCR o PCR, las moléculas de ADN eran previamente purificadas mediante el *kit High Pure PCR Product Purification Kit* (Roche). Tras comprobar el resultado de dicha purificación mediante electroforesis en gel de agarosa, se realizaba la reacción de secuenciación con el *kit ABI Prism*[®] *BigDye*[™] *Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v2.0* (PE Biosystems). La

reacción de secuenciación era analizada en un secuenciador automático en la *Unitat de Genòmica* de los *Serveis Científicotècnics* de la Universitat de Barcelona.

El protocolo se detalla a continuación:

1. Purificar el ADN a secuenciar mediante el kit *High Pure PCR Product Purification Kit* (Roche).
2. Preparar la mezcla de reacción de secuenciación:

§	<i>Terminator Ready Reaction mix</i>	2 µl
§	Cebador 5 µM.....	0.64 µl
§	ADN purificado.....	0.2 – 0.5 µg
§	H ₂ O _{bd} esterilizada por autoclave 45'.....	hasta 10 µl totales

3. Realizar el programa de secuenciación:

10 sec a 96 °C	} x 25 ciclos
5 sec a 50 °C	
4 min a 60 °C	

4. Purificar el producto de la reacción de secuenciación por precipitación con etanol:
 - 4.1. Mezclar los 10 µl del producto de la reacción de secuenciación con 64 µl de etanol 95% y 26 µl de H₂O_{bd}.
 - 4.2. Mixotubar y dejar precipitar durante 20 min a temperatura ambiente.
 - 4.3. Centrifugar a 10000 g durante 15 min.
 - 4.4. Lavar el precipitado con 0.2 ml de etanol 70%.
 - 4.5. Centrifugar a 10000 g durante 5 min.
 - 4.6. Descartar el sobrenadante y dejar secar el precipitado a temperatura ambiente.
5. Analizar la muestra en el secuenciador automático *ABI Prism 3700* (PE Biosystems).
6. Evaluar la secuencia resultante con el programa informático *Chromas*.

7.9. PURIFICACIÓN DE ADN DE BAJO PESO MOLECULAR

Los *kits* comerciales de purificación de ADN no permiten una buena recuperación de moléculas de bajo peso molecular. Para la purificación de este tipo de moléculas nos basamos en la técnica de purificación de ADN mediante precipitación con etanol y acetato sódico 3 M siguiendo el siguiente procedimiento:

1. Añadir al ADN a purificar un 10% (v/v) de acetato sódico 3 M pH 5.2 y homogeneizar 30 sec por agitación.
2. Añadir 3 volúmenes de etanol absoluto enfriado a -20 °C y homogeneizar 30 sec por agitación.
3. Añadir MgCl₂ a una concentración final de 0.01 M y mantener la solución a -20 °C durante 12 h.
4. Centrifugar 30 min a 14000 g descartando el sobrenadante resultante y lavar el precipitado dos veces con 500 µl etanol 70% cada vez.
5. Finalmente, secar el precipitado y resuspenderlo en 50 µl de H₂O_{bd}.

7.10. TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS *E. Coli* COMPETENTES

Las células competentes fueron transformadas con el producto de ligación por tratamiento térmico, y se seleccionaron las colonias transformadas en placas con medio LB-agar suplementado con los diferentes antibióticos de selección siguiendo el siguiente procedimiento:

1. Descongelar 40 µl células competentes en hielo.
2. Añadir 10 µl del producto de clonación e incubar 30 min en hielo.
3. Incubar 45 sec a 42 °C e inmediatamente incubar 2 min en hielo.
4. Añadir 450 µl medio SOC (Invitrogen) e incubar 1h 30 min a 37 °C en agitación.
5. Sembrar en placas con medio LB-agar suplementado con los antibióticos de selección a razón de 100 µl por placa e incubar 24 h a 37 °C.

7.11. TRANSCRIPCIÓN *IN VITRO*

La transcripción *in vitro* con el *kit Riboprobe® in vitro Transcription System-T7* (Promega) se realizó siguiendo el siguiente procedimiento:

1. Preparar la mezcla de reacción de transcripción *in vitro*:

§	Tampón <i>Transcription Optimized 5X</i>	10 µl
§	100 mM DTT.....	5 µl
§	Inhibidor de ribonucleasas <i>RNasin</i> [®] (40 U/µl).....	1.25 µl
§	rNTPs 10 mM (2.5 mM de cada uno).....	10 µl
§	ADN molde (1.25 mg/ml).....	0.8 µl
§	<i>T7 RNA Polymerase</i> (15 U/µl).....	1.33 µl
§	H ₂ O _{bd} libre de ribonucleasas.....	<u>21.62 µl</u>
		50 µl

2. Incubar 2 h a 37 °C.
3. Eliminar el ADN molde añadiendo 1 U Desoxiribonucleasa *RQ1 RNase-Free DNase* (Promega) e incubar 15 min a 37 °C.
4. Extraer el producto de transcripción añadiendo 50 µl fenol : cloroformo : alcohol isoamílico (25 : 24 : 1), agitando 1 min y centrifugando 2 min a 14000 g.
5. Separar la fase acuosa y añadir, a ésta, 50 µl cloroformo: alcohol isoamílico (24 : 1), agitar 1 min y centrifugar 2 min a 14000 g.
6. Separar la fase acuosa y añadir, a ésta, 25 µl acetato de amonio 7.5 M y 125 µl etanol 100% enfriado a -20 °C.
7. Homogeneizar y mantener 30 min a -70 °C.
8. Centrifugar 20 min a 14000 g descartando el sobrenadante resultante.
9. Lavar el precipitado con 500 µl etanol 70% enfriado a -20 °C.
10. Centrifugar 20 min a 14000 g descartando el sobrenadante resultante.
11. Secar el precipitado y resuspenderlo en 50 µl de H₂O libre de ribonucleasas.
12. Cuantificar el ARN en el espectrofotómetro por lectura a 260 nm y 280 nm.

7.12. INMUNOFLUORESCENCIA

Para realizar la detección de proteína vírica por inmunofluorescencia, monocapas celulares eran crecidas (para CaCo-2) o sembradas (para Sf9) sobre cubreobjetos colocados en el interior de pocillos de microplacas de 24 pocillos. La infección con el correspondiente virus se realizaba tal y como se describe en el apartado 7.2. A los 2-3 días post-infección, el marcaje fluorescente era realizado dentro del mismo pocillo a temperatura ambiente siguiendo el siguiente protocolo:

1. Descartar el medio de cultivo y lavar las células 2 veces con 0.5 ml de tampón PBS.
2. Fijar las células con 0.3 ml de solución de fijación al 3% PF durante 30 min.
3. Lavar las células 2 veces con 0.5 ml de tampón PBS.

4. Incubar las células en 0.5 ml de solución de lavado durante 20 min.
5. Permeabilizar las células en 0.3 ml solución de permeabilización durante 15 min.
6. Lavar las células 3 veces con 0.5 ml de solución de lavado.
7. Bloquear las preparaciones con 0.5 ml solución de bloqueo durante 30 min.
8. Incubar 1-2 h con el anticuerpo primario a la dilución correspondiente en solución de bloqueo.
9. Repetir paso 6.
10. Incubar con el anticuerpo secundario conjugado con el fluorocromo (FITC, Cya3, ...) a la dilución correspondiente en solución de bloqueo durante 1 h en la oscuridad.
11. Repetir paso 6.
12. Incubar las células en tampón PBS suplementado con 1 µg/ml DAPI (Roche) para teñir los núcleos durante 15 min en la oscuridad.
13. Lavar las células 1 vez con 0.5 ml de solución de lavado.
14. Sacar el cubreobjetos del pocillo, secarlo suavemente y colocarlo invertido sobre una gota de medio de montaje Fluoromont G (Southern Biotechnologies) sobre un portaobjetos de vidrio.
15. Guardarlo a 4 °C en oscuridad hasta su observación bajo microscopio de fluorescencia (Leica DMRB FLUO).

- **Soluciones necesarias:**

Tampón PBS: ver apartado 7.1.1.

Solución de fijación (3% PF): PF 20%.....1.5 ml
 Sacarosa 1M..... 0.6 ml
 Tampón fosfato PB 0.2M.....5 ml
 H₂O_{bd}..... 2.9 ml
Conservar a 4 °C.

Tampón fosfato PB 1M: A 800 ml de fosfato dipotásico 1M se le va añadiendo fosfato monosódico 1M hasta que el pH quede ajustado a 7.4.
Conservar a temperatura ambiente.

Paraformaldehido (PF) 20%: Disolver 20 g de PF en 80 ml de H₂O_{bd} en un baño a 75 °C. Añadir 2-3 gotas de NaOH 5N para facilitar su disolución. Una vez disuelto, enrasar hasta 100 ml con H₂O_{bd} y filtrar a través de papel de filtro.
Conservar a -20 °C.

Tampón fosfato PB 0.2M: Diluir el tampón fosfato PB 1M 1:5 en H₂O_{bd}.
Conservar a temperatura ambiente.

Solución de lavado: Glicina..... 20 mM
Tampón PBS
Preparación y uso inmediato.

Solución de permeabilización: Tritón X-100..... 0.5% (v/v)
Glicina..... 20 mM
Tampón PBS
Preparación y uso inmediato.

Solución de bloqueo: SFB..... 10% (v/v)
Glicina..... 20 mM
Tampón PBS
Preparación y uso inmediato.

7.13. TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS SF9 CON *BACMID*[®] RECOMBINANTES

La transfección de células Sf9 se realizó con la ayuda de *Cellfectin*[®] siguiendo el siguiente protocolo:

1. Sembrar 9 x 10⁵ células en una placa de 35 mm de diámetro. Dejar sedimentar las células durante 1 h a temperatura ambiente.
2. Mientras tanto, preparar las soluciones A y B de transfección:
 - a. Solución A: 5 µl *Bacmid*[®] recombinantes + 100 µl medio TC-100.
 - b. Solución B: 6 µl *Cellfectin*[®] + 100 µl medio TC-100.
3. Mezclar las soluciones A y B e incubar durante 45 min a temperatura ambiente.
4. Añadir 0.8 ml TC-100 sin antibióticos a la mezcla de transfección.
5. Una vez sedimentadas las células, descartar el medio, lavarlas con medio TC-100 sin antibióticos y añadir la mezcla de transfección. Incubar durante 5 h a 28 °C.
6. Descartar la mezcla de transfección y añadir 2 ml TC-100 + 10% SFBi. Incubar 72 h a 28 °C en una atmósfera húmeda.
7. Recoger células y medio de cultivo, centrifugar a 1000 g durante 10 min y recuperar el sobrenadante donde se encuentran los baculovirus recombinantes.

7.14. ELECTROFORESIS SDS-PAGE, TINCIÓN CON AZUL DE COMASSIE Y WESTERN BLOT

El siguiente protocolo está diseñado para la utilización de cubetas de electroforesis vertical con geles de un tamaño de 7 cm x 8 cm x 0.75 mm (*Mini Protean® II* (Bio-Rad)).

La preparación del gel de acrilamida en condiciones desnaturalizantes se realizó a partir de las siguientes soluciones polimerizantes:

Reactivo	Gel 10% Acrilamida	Gel separador
Acrilamida 30%	1.7 ml	0.33 ml
Tris-HCl 1.5M pH 8.8	1.3 ml	-
Tris-HCl 1M pH 6.8	-	0.25 ml
H ₂ O	2 ml	1.4 ml
SDS 10%	50 µl	20 µl
APS 10%	50 µl	20 µl
TEMED	2 µl	2 µl

Una vez había polimerizado el gel, se procedía a realizar la electroforesis siguiendo el siguiente protocolo:

- 1.- Mezclar 20 µl de muestra con 5 µl de tampón Laemli 5X.
- 2.- Desnaturalizar la muestra durante 5 min a 100 °C y colocarla inmediatamente después en hielo.
- 3.- Cargar las muestras en el gel colocado dentro de la cubeta con tampón de carrera 1X.
- 4.- Hacer correr la electroforesis a 120V durante aproximadamente 2 h
- 5.- Teñir el gel con solución de Azul de Comassie para hacer una detección de proteína total o realizar una transferencia de proteínas a una membrana de nitrocelulosa (*western blot*) para realizar una detección de proteínas específicas.

Para la detección de proteína total, el gel era teñido durante 1 h en una solución de Azul de Comassie y posteriormente, el exceso de colorante era extraído con solución decolorante.

Para la transferencia de proteínas a una membrana de nitrocelulosa (Schleicher & Schuell) se utiliza un sistema semi-seco empleando el *Trans-blot® Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell* (Bio-Rad) siguiendo los siguientes pasos:

- 1.- La membrana de nitrocelulosa y el gel de poliacrilamida se incuban durante 5 min en agua destilada.
- 2.- Se colocan la membrana, el gel y papeles de filtro empapados en tampón de transferencia en el siguiente orden: 3 x papeles de filtro, membrana de nitrocelulosa, gel de poliacrilamida y 3 x papeles de filtro.
- 3.- Realizar la transferencia a 70 mA durante 70 min.

Para realizar la detección de proteínas con anticuerpos específicos se seguía el siguiente protocolo:

- 1.- Bloquear la membrana de nitrocelulosa en tampón de bloqueo durante 12 h a 4°C.
- 2.- Incubar la membrana con el anticuerpo primario a la dilución correspondiente en tampón de bloqueo durante 2 h a temperatura ambiente.
- 3.- Realizar tres lavados en tampón PBS de 10 min cada uno a temperatura ambiente.
- 4.- Incubar la membrana durante 2 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario marcado con fosfatasa alcalina a la dilución correspondiente en tampón de bloqueo.
- 5.- Repetir paso 3.
- 6.- Lavado de 5 min a temperatura ambiente en tampón fosfatasa alcalina.
- 7.- Revelar la membrana en tampón de revelado hasta que aparezca el marcaje deseado.

• **Soluciones necesarias:**

Tampón Laemli 5X:

Tris-HCl 1M (pH 6.8).....	25% (v/v)
Glicerol.....	40% (v/v)
β-mercaptoetanol.....	25% (p/v)
SDS.....	1% (p/v)
Azul de bromofenol.....	0.025% (p/v)

Conservar a 4 °C.

Tampón de carrera 5X:

Tris-HCl	125 mM
Glicina.....	1 M
SDS.....	0.5% (p/v)
H ₂ O _{bd}	

Conservar a temperatura ambiente.

Solución Azul de Comassie: Azul de Comassie..... 0.25% (p/v)
 Metanol.....50% (v/v)
 Ácido acético glacial..... 7.5% (v/v)
 H₂O_{bd}
Conservar a temperatura ambiente.

Solución decolorante: Ácido acético glacial..... 7.5% (v/v)
 Metanol.....5% (v/v)
 H₂O_{bd}
Conservar a temperatura ambiente.

Tampón de transferencia: Tris-HCl..... 50 mM
 Glicina.....40 mM
 SDS..... 0.04% (p/v)
 Metanol.....20% (v/v)
 H₂O_{bd}
pH 8.3
Conservar a temperatura ambiente.

Tampón de bloqueo: Tris-HCl..... 50 mM
 NaCl.....40 mM
 H₂O_{bd}
pH 7.6
 Leche descremada en polvo.... 5% (p/v)
Conservar a 4°C.

Tampón de revelado: Tampón fosfatasa alcalina.....10 ml
 NBT (Roche).....45 µl
 X-Phosphate (Roche).....35 µl
Preparación y uso inmediato.

Acrilamida 30%: ver apartado 7.7.

Tampón de revelado: ver apartado 7.5.

8. APÉNDICE II:

BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía.

A

Abad, F. X., R. M. Pintó, C. Villena, R. Gajardo, & A. Bosch. 1997. Astrovirus survival in drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 3119-3122.

Abad, F. X., C. Villena, S. Guix, S. Caballero, R. M. Pintó, & A. Bosch. 2001. Potential role of fomites in the vehicular transmission of human astroviruses. *Appl. Environ. Microbiol.* 37: 3904-3907.

Appleton, H. & P. G. Higgins. 1975. Viruses and gastroenteritis in infants. *Lancet* 1: 1297.

Aroonprasert, D., J. A. Fagerland, N. E. Kelso, S. Zheng, & G. N. Woode. 1989. Cultivation and partial characterization of bovine astrovirus. *Vet. Microbiol.* 19: 113-125.

Ashley, C. R. & E. O. Caul. 1982. Potassium tartrate-glycerol as a density gradient substrate for separation of small, round viruses from human faeces. *J. Clin. Microbiol.* 16: 377-381.

Atmar, R. L., F. H. Neill, J. L. Romalde, F. Le Guyader, C. M. Woodley, T. G. Metcalf, & M. K. Estes. 1995. Detection of Norwalk virus and Hepatitis A virus in shellfish tissues with the PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 3014-3018.

B

Bass, D. M. & U. Upadhyayula. 1997. Characterization of human serotype 1 astrovirus-neutralizing epitopes. *J. Virol.* 71: 8666-8671.

Bass, D. M. & S. Qiu. 2000. Proteolytic processing of the astrovirus capsid. *J. Virol.* 74: 1810-1814.

Belliot, G., H. Laveran, & S. S. Monroe. 1997a. Capsid protein composition of reference strains and wild isolates of human astroviruses. *Virus Res.* 49: 49-57.

Belliot, G., H. Laveran, & S. S. Monroe. 1997b. Outbreak of gastroenteritis in military recruits associated with serotype 3 astrovirus infection. *J. Med. Virol.* 51: 101-106.

Belliot, G., H. Laveran, & S. S. Monroe. 1997c. Detection and genetic differentiation of human astroviruses: phylogenetic grouping varies by coding region. *Arch. Virol.* 142: 1323-1334.

Belliot, G., R. L. Fankhauser, & S. S. Monroe. 2001. Characterization of "Norwalk-like viruses" and astroviruses by liquid hybridization assay. *J. Virol. Methods* 91: 119-130.

Berthiaume, L., R. Alain, B. McLaughlin, P. Paymen, & P. Trepanier. 1981. Rapid detection of human viruses in faeces by a simple and routine immune electron microscopy technique. *J. Gen. Virol.* 55: 223-227.

Bertolotti-Ciarlet, A., L. J. White, R. Chen, B. V. V. Prasad, & M. K. Estes. 2002. Structural requirements for the assembly of Norwalk virus-like particles. *J. Virol.* 76: 4044-4055.

Björkholm, M., F. Celsing, G. Runarsson, & J. Waldenström. 1995. Successful intravenous immunoglobulin therapy for severe and persistent astrovirus gastroenteritis after fludarabine treatment in a patient with Waldenstrom's macroglobulinemia. *Int. J. Hematol.* 62: 117-120.

Blom, N., S. Gammeltoft, & S. Brunak. 1999. Sequence and structure based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J. Mol. Biol.* 294: 1351-1362.

Bon, F., P. Fascia, M. Dauvergne, D. Tenenbaum, H. Planson, A. M. Petion, P. Pothier, & E. Kohli. 1999. Prevalence of group A rotavirus, human calicivirus, astrovirus, and adenovirus type 40 and 41 infections among children with acute gastroenteritis in Dijon, France. *J. Clin. Microbiol.* 37: 3055-3058.

Boom, R., C. J. A. Sol, M. M. M. Salimans, C. L. Jansen, P. M. E. Wertheim-van Dillen, & J. van der Noordaa. 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.* 28: 495-503.

C

Caballero, S., F. X. Abad, F. Loisy, F.S. Le Guyader, J. Cohen, R. M. Pintó, & A. Bosch. 2004. Rotavirus virus-like particles as surrogates in environmental persistence and inactivation studies. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70: 3904-3909.

Carter, M. J. & M. M. Willcocks. 1996. The molecular biology of astroviruses. *Arch. Virol.* 12(Suppl): 277-285.

Castón, J. R., Y. de Isidro, A. Sánchez-Fauquier, & J. L. Carrascosa. 1999. Estructura de virus icosaédricos por criomicroscopía de especímenes vitrificados. Congreso Nacional de Microscopía de la Sociedad Española de Virología.

Caul, E. O. & H. Appleton. 1982. The electron microscopical and physical characteristics of small round human fecal viruses. *J. Med. Virol.* 9: 257-265.

Chapron, C. D., N. A. Ballester, J. H. Fontaine, C. N. Frades, & A. B. Margolin. 2000. Detection of astroviruses, enteroviruses, and adenovirus types 40 and 41 in surface waters collected and evaluated by the information collection rule and an integrated cell culture-nested PCR procedure. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 2520-2525.

Charpilienne, A., M. Nejmeddine, M. Berois, N. Parez, E. Neumann, E. Hewat, G. Trugnan, & J. Cohen. 2001. Individual rotavirus-like particles containing 120 molecules of fluorescent protein are visible in living cells. *J. Biol. Chem.* 276: 29361-29367.

Cohen, J., J. Laporte, A. Charpilienne, & R. Scherrer. 1979. Activation of rotavirus RNA polymerase by calcium chelation. *Arch. Virol.* 60: 177-186.

Conner, M. E., C. D. Zarley, B. Hu, S. Parsons, D. Drabinski, S. Greiner, R. Smith, B. Jiang, B. Corsaro, V. Barniak, H. P. Madore, S. Crawford, & M. K. Estes. 1996. Virus-like particles as a rotavirus subunit vaccine. *J. Infect. Dis.* 174 Suppl 1:S88-S92.

Coppo, P., C. Scieux, F. Ferchald, J. Clauvel, & K. Lassoued. 2000. Astrovirus enteritis in a chronic lymphocytic leukemia patient treated with fludarabine monophosphate. *Ann. Hematol.* 79: 43-45.

Cox, G. J., S. M. Matsui, R. S. Lo, M. Hinds, R. A. Bowden, R. C. Hackman, W. G. Meyer, M. Mori, P. I. Tarr, L. S. Oshiro, et al. 1994. Etiology and outcome of diarrhea after marrow transplantation: a prospective study. *Gastroenterology* 107: 1398-1407.

Crawford, S. E., M. Labbé, J. Cohen, M. H. Burroughs, Y. Zhou, & M. K. Estes. 1994. Characterization of virus-like particles produced by the expression of rotavirus capsid proteins in insect cells. *J. Virol.* 68: 5946- 5952.

Cruz, J. R., A. V. Bartlett, J. E. Herrmann, P. Caceres, N. R. Blacklow, & F. Cano. 1992. Astrovirus-associated diarrhea among Guatemalan ambulatory rural children. *J. Clin. Microbiol.* 30: 1140-1144.

Cubitt, D. W., D. K. Mitchell, M. J. Carter, M. M. Willcocks, & H. Holzel. 1999. Application of electronmicroscopy, enzyme immunoassay, and RT-PCR to monitor an outbreak of astrovirus type 1 in a pediatric bone marrow transplant unit. *J. Med. Virol.* 57: 313-321.

Cunliffe, N. A., W. Dove, J. S. Gondwe, B. D. M. Thindwa, J. Greensill, J. L. Holmes, J. S. Bresee, S. S. Monroe, R. I. Glass, R. L. Broadhead, M. E. Molyneux, & C. A. Hart. 2002. Detection and characterisation of human astroviruses in children with acute gastroenteritis in Blantyre, Malawi. *J. Med. Virol.* 67: 563-566.

D

Dalton, R. M., E. R. Román, A. A. Negrodo, I. D. Wilhemi, R. I. Glass, & A. Sánchez-Fauquier. 2002. Astrovirus acute gastroenteritis among children in Madrid, Spain. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 11: 1038-1041.

Dalton, R. M., E. P. Pastrana, & A. Sánchez-Fauquier. 2003. Vaccinia virus recombinant expressing an 87-kilodalton polyprotein that is sufficient to form astrovirus-like particles. *J. Virol.* 77: 9094-9098.

Donnelly, G., F. Superti, A. Tinari, & M. L. Marziano. 1992. Mechanism of astrovirus entry into Graham 293 cells. *J. Med. Virol.* 38: 217-225.

E

El Mehdaoui, S., A. Touzé, S. Laurent, P. Sizaret, D. Rasschaert, & P. Coursaget. 2000. Gene transfer using recombinant rabbit hemorrhagic disease virus capsids with genetically modified DNA encapsidation capacity by addition of packaging sequences for the L1 and L2 protein of human papillomavirus type 16. *J. Virol.* 74: 10332-10340.

Englund, L., M. Chriel, H. H. Dietz, & K. O. Hedlund. 2002. Astrovirus epidemiologically linked to pre-weaning diarrhoea in mink. *Vet. Microbiol.* 85: 1-11.

Estes, M. K., D. Y. Graham, E. M. Smith, & C. P. Gerba. 1979. Rotavirus stability and inactivation. *J. Gen Virol.* 43: 403-409.

F

Foley, B., J. O'Mahony, S. M. Morgan, C. Hill, & J. G. Morgan. 2000 Detection of sporadic cases of Norwalk-like virus (NLV) and astrovirus infection in a single Irish hospital from 1996 to 1998. *J. Clin. Virol.* 17: 109-117.

Fraser, M. J. 1986. Ultrastructural observations of virion maturation in *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus infected *Spodoptera frugiperda* cell cultures. *J. Ultrastruct. Mol. Struc. Res.* 95: 189-195.

French, T. J. & P. Roy. 1990. Synthesis of bluetongue (BTV) corelike particles by a recombinant baculovirus expressing the two major structural core proteins of BTV. *J. Virol.* 64: 1530-1536.

Funk, C. J., S. C. Braunagel, & G. F. Rohrmann. 1997. The baculoviruses, p. 7-27. In L. K. Miller. Plenum, New York.

G

Gaggero, A., M. O'Ryan, J. S. Noel, R. I. Glass, S. S. Monroe, N. Mamani, V. Prado, & L. F. Avendaño. 1998. Prevalence of astrovirus infection among Chilean children with acute gastroenteritis. *J. Clin. Microbiol.* 36: 3691-3693.

Gajardo, R., P. Vende, D. Poncet, & J. Cohen. 1997. Two proline residues are essential in the calcium-binding activity of rotavirus VP7 outer capsid protein. *J. Virol.* 71: 2211-2216.

Geigenmüller, U., N. H. Ginzton, & S. M. Matsui. 1997. Construction of a genome-length cDNA clone for human astrovirus serotype 1 and synthesis of infectious RNA transcripts. *J. Virol.* 71: 1713-1717.

Geigenmüller, U., T. Chew, N. Ginzton, & S. M. Matsui. 2002a. Processing of nonstructural protein 1a of human astrovirus. *J. Virol.* 76: 2003-2008.

Geigenmüller, U., N. H. Ginzton, & S. M. Matsui. 2002b. Studies on intracellular processing of the capsid protein of human astrovirus serotype 1 in infected cells. *J. Gen. Virol.* 83: 1691-1695.

Gibson, C. A., J. Chen, S. A. Monroe, & M. R. Denison. 1998. Expression and processing of nonstructural proteins of the human astroviruses. *Adv. Exp. Med. Biol.* 440: 387-391.

- Glass, R. I., J. Noel, D. Mitchell, J. E. Herrmann, N. R. Blacklow, L. K. Pickering, P. Dennehy, G. Ruiz-Palacios, M. L. de Guerrero, & S. S. Monroe.** 1996. The changing epidemiology of astrovirus-associated gastroenteritis: a review. *Arch. Virol.* 12(Suppl.): 287-300.
- González, G. G., F. H. Pujol, F. Liprandi, L. Deibis, & J. E. Ludert.** 1998. Prevalence of enteric viruses in human immunodeficiency virus seropositive patients in Venezuela. *J. Med. Virol.* 55: 288-292.
- Gough, R. E., M. S. Collins, E. Borland, & I. F. Keymer.** 1984. Astrovirus-like particles associated with hepatitis in ducklings. *Vet. Rec.* 114: 279.
- Grace, T. D. C.** 1962. Establishment of four strains of cells from insect tissues grown in vitro. *Nature* 195: 788-789.
- Gray, J. J., T. G. Wreghitt, W. D. Cubitt, & P. R. Elliot.** 1987. An outbreak of gastroenteritis in a home for the elderly associated with astrovirus type 1 and human calicivirus. *J. Med. Virol.* 23: 377-381.
- Greenberg, H. B., J. R. Valdesuso, A. R. Kalica, R. G. Wyatt, V. J. McAuliffe, A. Z. Kapikian, & R. M. Chanock.** 1981. Proteins of Norwalk virus. *J. Virol.* 37: 994-999.
- Greenberg, H. B. & S. M. Matsui.** 1992. Astroviruses and caliciviruses: emerging enteric pathogens. *Infect. Agents Dis.* 1: 71-91.
- Guerrero, M. L., J. S. Noel, D. K. Mitchell, J. J. Calva, A. L. Morrow, J. Martínez, G. Rosales, F. R. Velázquez, S. S. Monroe, R. I. Glass, L. K. Pickering, & G. M. Ruiz-Palacios.** 1998. A prospective study of astrovirus diarrhea of infancy in Mexico City. *Pediatr. J. Infect. Dis.* 17: 723-727.
- Guix, S., S. Caballero, C. Villena, R. Bartolomé, C. Latorre, N. Rabella, M. Simó, A. Bosch, & R. M. Pintó.** 2002. Molecular epidemiology of astrovirus infection in Barcelona, Spain. *J. Clin. Microbiol.* 40: 133-139.
- Guix, S., A. Bosch, E. Ribes, L. Dora Martínez, & R. M. Pintó.** 2004a. Apoptosis in astrovirus-infected CaCo2 cells. *Virology* 319: 249-261.
- Guix, S., S. Caballero, A. Bosch, & R. M. Pintó.** 2004b. C-terminal nsP1a protein of human astrovirus colocalizes with the endoplasmic reticulum and viral RNA. *J. Virol.* 78: Dec. In press.

Guix, S., S. Caballero, A. Bosch, & R. M. Pintó. *Manuscrito en preparación.* Genetic analysis of the hypervariable region of the human astrovirus nsP1a coding region: design of a new RFLP typing method.

Gupta, R. & S. Brunak. *Manuscrito en preparación.* Identifying intracellular O-(beta)-GlcNAc “yin-yang” switches in the available human proteome. <http://cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>.

H

Hahn, W. R., & J. H. Strauss. 1988. Processing of the nonstructural polyproteins of Sindbis virus: study of the kinetics in vivo using monoespecific antibodies. *J. Virol.* 62: 998-1007.

Harbour, D. A., C. R. Ashley, P. D. Williams, & T. J. Gruffydd-Jones. 1987. Natural and experimental astrovirus infection of cat. *Vet. Rec.* 120: 555-557.

Herrmann, J. E., R. W. Hudson, D. M. Perron-Henry, J. B. Kurtz, & N. R. Blacklow. 1988. Antigenic characterization of cell-cultivated astrovirus serotypes and development of astrovirus-specific monoclonal antibodies. *J. Infect. Dis.* 158: 182-185.

Herrmann, J. E., N. A. Nowak, D. M. Perron-Henry, R. W. Hudson, W. D. Cubitt, & N. R. Blacklow. 1990. Diagnosis of astrovirus gastroenteritis by antigen detection with monoclonal antibodies. *J. Infect. Dis.* 161: 226-229.

Herrmann, J. E., D. N. Taylor, P. Echeverria, & N. R. Blacklow. 1991. Astroviruses as a cause of gastroenteritis in children. *N. Engl. J. Med.* 324: 1757-1760.

Higgins D., J. Thompson, T. Gibson, J. D. Thompson, D. G. Higgins, & T. J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22: 4673-4680.

Hink, W. F. 1970. Established insect cell line from the cabbage looper, *Trichoplusia ni*. *Nature* 226: 466-467.

Hink, W. F. & P. V. Vail. 1973. A plaque assay for titration of alfalfa looper nuclear polyhedrosis virus in a cabbage looper TN-368 cell line. *J. Invert. Pathol.* 22: 168-174.

Hoshino, Y., J. F. Zimmer, N. S. Moise, & F. W. Scott. 1981. Detection of astroviruses in faeces of a cat with diarrhoea. *Arch. Virol.* 70: 373-376.

I

Imada, T., S. Yamaguchi, & H. Kawamura. 1979. Pathogenicity for baby chicks of the G-4260 strain of the picornavirus "avian nephritis virus". *Avian Dis.* 23: 582-588.

J

Jarvis, D. L., D. A. Bohlmeier, & A. J. García. 1991. Requirements for nuclear localization and supramolecular assembly of a baculovirus polyhedrin protein. *Virology* 185: 795-810.

Jarvis, D. L. 1997. Baculovirus expression vectors. In: Miller LK, (ed.), *The baculoviruses*. New York: Plenum: 389-831.

Jiang, B., S. S. Monroe, E. V. Koonin, S. E. Stine, & R. I. Glass. 1993. RNA sequence of astrovirus: distinctive genomic organization and a putative retrovirus-like ribosomal frameshifting signal that directs the viral replicase synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 10539-10543.

Jiang, X., M. Wang, D. Y. Graham, & M. K. Estes. 1992. Expression, self-assembly, and antigenicity of the Norwalk virus capsid protein. *J. Virol.* 66: 6527-6532.

Jonassen, C. M., T. O. Jonassen, Y. M. Saif, D. R. Snodgrass, H. Ushijima, M. Shimizu, & B. Grinde. 2001. Comparison of capsid sequences from human and animal astroviruses. *J. Gen. Virol.* 82: 1061-1067.

Jonassen, C. M., T. O. Jonassen, T.M. Sveen, & B. Grinde. 2003. Complete genomic sequences of astroviruses from sheep and turkey: comparison with related viruses. *Virus Res.* 91: 195-201.

Jonassen, T. O., E. Kjeldsberg, & B. Grinde. 1993. Detection of human astrovirus serotype 1 by the polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods* 44: 83-88.

K

Kang, Y. H., Y. K. Park, J. B. Ahn, J. D. Yeun, & Y. M. Lee. 2002. Identification of human astrovirus from stool samples with diarrhea in Korea. *Arch. Virol.* 147: 1821-1827.

Kapikian, A. Z., R. G. Wyatt, R. Dolin, T. S. Thornhill, A. R. Kalica, & R. M. Chanock. 1972. Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *J. Virol.* 10: 1075-1081.

- Kiang, D. & S. M. Matsui.** 2002. Proteolytic processing of a human astrovirus nonstructural protein. *J. Gen. Virol.* 83: 25-34.
- Kjeldsberg E.** 1977. Small spherical viruses in faeces from gastroenteritis patients. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 85B: 351-354.
- Kjeldsberg E.** 1994. Serotyping of human astrovirus strains by immunogold staining electron microscopy. *J. Virol. Methods* 50: 137-144.
- Kleiboeker, S. B.** 2003. Applications of competitor RNA in diagnostic reverse transcription-PCR. *J. Clin. Microbiol.* 41: 2055-2061.
- Koci, M. D., B. S. Seal, & S. Schultz-Cherry.** 2000. Molecular characterization of an avian astrovirus. *J. Virol.* 74: 6173-6177.
- Kohno, H., K. Watanabe, H. Nomura, H. Nomura, M. Oseto, & H. Ushijima.** 2000. Development of simple latex agglutination test for detection of astrovirus serotype 1. *Rinsho Biseibutsu Jinsoku Shindan Kenkyukai Shi* 11: 87-91.
- Komoriya, T., H. Kohno, A. Kimura, & H. Ushijima.** 2003. The development of sensitive latex agglutination tests for detecting astrovirus (serotypes 1 and 3) from clinical stool specimen. *Rinsho Biseibutsu Jinsoku Shindan Kenkyukai Shi* 13: 103-114.
- Konno, T., H. Suzuki, N. Ishida, R. Chiba, K. Mochizuki, & A. Tsunoda.** 1982. Astrovirus-associated epidemic gastroenteritis in Japan. *J. Med. Virol.* 9: 11-17.
- Koonin, E. V.** 1991. The phylogeny of RNA-dependent RNA polymerases of positive-strand RNA viruses. *J. Gen. Virol.* 71: 2197-2206.
- Koopmans, M. P. G., M. H. L. Bijen, S. S. Monroe, & J. Vinjé.** 1998. Age-stratified seroprevalence of neutralizing antibodies to astrovirus types 1 to 7 in humans in The Netherlands. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 5: 33-37.
- Kost, T. A. & J. P. Condreay.** 1999. Recombinant baculoviruses as expression vectors for insect in mammalian cells. *Curr. Opin. Biotechnol.* 10: 428-433.
- Kosukegawa, A., F. Arisaka, M. Takayama, H. Yahina, A. Kaidow, & H. Handa.** 1996. Purification and characterization of virus-like particles and pentamers produced by the expression of SV40 capsid proteins in insect cells. *Bioch. et Bioph. Acta* 1920: 37-45.

Kriston, S., M. M. Willcocks, M. J. Carter, & W. D. Cubitt. 1996. Seroprevalence of astrovirus types 1 to 6 in London determined using recombinant virus antigen. *Epidemiol. Infect.* 117: 159-164.

Kurtz, J. B., T. W. Lee, J. W. Craig, & S. E. Reed. 1979. Astrovirus infection in volunteers. *J. Med. Virol.* 3: 221-230.

Kurtz, J. B., T. W. Lee, & A. J. Parson. 1980. The action of alcohols on rotavirus, astrovirus and enterovirus. *J. Hosp. Infec.* 1: 321-325.

Kurtz, J. B. & T. W. Lee. 1984. Human astrovirus serotypes. *Lancet* 2: 1405.

Kurtz, J. B. & T. W. Lee. 1987. Human and animal. Novel Diarrhoea Viruses. Ciba Foundation symposium 128. Chichester: Wiley, 92-107.

L

LaStarza, M. W., A. Grakoui, & C. M. Rice. 1994a. Deletion and duplication mutations in the C-terminal nonconserved region of Sindbis virus: effects on phosphorylation and on virus replication in vertebrate and invertebrate cells. *Virology* 202: 224-232.

LaStarza, M. W., J. A. Lemm, & C. M. Rice. 1994b. Genetic analysis of the nsP3 region of Sindbis Virus: evidence for roles in minus-strand and subgenomic RNA synthesis. *J. Virol.* 68: 5781-5781.

Le Cann, P., S. Ranarijaona, S. Monpoeho, F. Le Guyader, & V. V. Ferre. 2004. Quantification of human astroviruses in sewage using real-time RT-PCR. *Res. Microbiol.* 155: 11-15.

Le Guyader, F., L. Haugarreau, L. Miossec, E. Dubois, & M. Pommepuy. 2000. Three-year study to assess human enteric viruses in shellfish. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 3241-3248.

Lee, T. W. & J. B. Kurtz. 1977. Astroviruses detected by immunofluorescence. *Lancet* 2: 406.

Lee, T. W. & J. B. Kurtz. 1981. Serial propagation of astrovirus in tissue culture with the aid of trypsin. *J. Gen. Virol.* 57: 421-424.

Lee, T. W. & J. B. Kurtz. 1994. Prevalence of human astrovirus serotypes in the Oxford region 1976-92, with evidence for two new serotypes. *Epidemiol. Infect.* 112: 187-193.

Lew, J. F., C. L. Moe, S. S. Monroe, J. R. Allen, B. M. Harrison, B. D. Forrester, S. E. Stine, P. A. Woods, J. C. Hierholzer, J. E. Herrmann et al. 1991. Astrovirus and adenovirus associated with diarrhea in children in day care settings. *J. Infect. Dis.* 164: 673-678.

Lewis, D. C., N. F. Lightfoot, W. D. Cubitt, & S. A. Wilson. 1989. Outbreaks of astrovirus type 1 and rotavirus gastroenteritis in a geriatric in-patient population. *J. Hosp. Infect.* 14: 9-14.

Lewis, T. L., H. B. Greenberg, J. E. Herrmann, L. S. Smith, & S. M. Matsui. 1994. Analysis of astrovirus serotype 1 RNA, identification of the viral RNA-dependent RNA polymerase motif, and expression of a viral structural protein. *J. Virol.* 68: 77-83.

Li, G., M. W. LaStarza, W. R. Hardy, J. H. Strauss, & C. M. Rice. 1990. Phosphorylation of Sindbis virus nsP3 in vivo and in vitro. *Virology* 179: 416-427.

López, L., F. J. Castillo, M. A. Fernández, A. Clavel, M. C. Rubio, R. Gómez-Lus, & B. Cutillas. 2000. Astrovirus infection among children with gastroenteritis in the city of Zaragoza, Spain. *J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 19: 545-547.

Lukashov, V. V. & J. Goudsmit. 2002. Evolutionary relationships among *Astroviridae*. *J. Gen. Virol.* 83: 1397-1405.

M

Madeley, C. R. & B. P. Cosgrove. 1975. 28 nm particles in faeces in infantile gastroenteritis. *Lancet* 2: 451-452.

Maldonado, Y., M. Cantwell, M. Old, D. Hill, M. L. Sánchez, L. Logan, F. Millán-Velasco, J. L. Valdespino, J. Sepúlveda, & S. Matsui. 1998. Population-based prevalence of symptomatic and asymptomatic astrovirus infection in rural Mayan infants. *J. Infect. Dis.* 178: 334-339.

Marczinke, B., A. J. Bloys, D. K. Brown, M. M. Willcocks, M. J. Carter, & I. Brierley. 1994. The human astrovirus RNA-dependent RNA polymerase coding region is expressed by ribosomal frameshifting. *J. Virol.* 68: 5588-5595.

Marx, F. E., M. B. Taylor, & W. O. K. Grabow. 1998. The application of a reverse transcriptase-polymerase chain reaction-oligonucleotide probe assay for the detection of human astroviruses in environmental water. *Water Res.* 32: 2147-2153.

Matsui, M., H. Ushijima, M. Hachiya, J. Kakizawa, L. Wen, M. Oseto, K. Morooka, & J. B. Kurtz. 1998. Determination of serotypes of astroviruses by reverse transcription-polymerase chain reaction and homologies of the types by the sequencing of Japanese isolates. *Microbiol. Immunol.* 42: 539-547.

Matsui, S. M., J. P. Kim, H. B. Greenberg, L. M. Young, L. S. Smith, T. L. Lewis, J. E. Herrmann, N. R. Blacklow, K. Dupuis, & G. R. Reyes. 1993. Cloning and characterization of human astrovirus immunoreactive epitopes. *J. Virol.* 67: 1712-1715.

Matsui, S. M. & H. B. Greenberg. 2001a. Astroviruses, p. 875-893. In: B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley, D. E. Griffin, M. A. Martin, R. A. Lamb, B. Roizman, and S. E. Strauss (ed.), *Fields virology*. Lippincott-Raven, Philadelphia. Pa.

Matsui, S. M., D. Kiang, N. Ginzton, T. Chew, & U. Geigenmüller-Gnirke. 2001b. Molecular biology of astroviruses: selected highlights. Gastroenteritis viruses. Novartis Foundation Symposium. 238: 219-236.

Medina, S. M., M. F. Gutierrez, F. Liprandi, & J. E. Ludert. 2000. Identification and type distribution of astroviruses among children with gastroenteritis in Colombia and Venezuela. *J. Clin. Microbiol.* 38: 3481-3483.

Méndez, E., T. Fernández-Luna, S. López, M. Méndez-Toss, & C. Arias. 2002. Proteolytic processing of a serotype 8 human astrovirus ORF2 polyprotein. *J. Virol.* 76: 7996-8002.

Méndez, E., M. P. E. Salas-Ocampo, M. E. Munguía, & C. F. Arias. 2003. Protein products of the open reading frames encoding nonstructural proteins of human astrovirus serotype 8. *J. Virol.* 77: 11378-11384.

Méndez-Toss, M., P. Romero-Guido, M. E. Munguía, E. Méndez, & C. F. Arias. 2000. Molecular analysis of a serotype 8 human astrovirus genome. *J. Gen. Virol.* 81: 2891-2897.

Méndez-Toss, M., D. D. Griffin, J. Calva, J. F. Contreras, F. I. Puerto, F. Mota, H. Guiscafre, R. Cedillo, O. Muñoz, I. Herrera, S. López, & C. F. Arias. 2004. Prevalence and genetic diversity of human astroviruses in Mexican children with symptomatic and asymptomatic infections. *J. Clin. Microbiol.* 42: 151-157.

Midthun, K., H. B. Greenberg, J. B. Kurtz, G. W. Gary, F. Y. Lin, & A. Z. Kapikian. 1993. Characterization and seroepidemiology of a type 5 astrovirus associated with an outbreak of gastroenteritis in Marin County, California. *J. Clin. Microbiol.* 31: 955-962.

- Mitchell, D. K., S. S. Monroe, X. Jiang, D. O. Matson, R. I. Glass, & L. K. Pickering.** 1995. Virologic features of an astrovirus diarrhea outbreak in a day care center revealed by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J. Infect. Dis.* 172: 1437-1444.
- Mitchell, D. K., D. O. Matson, X. Jiang, T. Berke, S. S. Monroe, M. J. Carter, M. M. Willcocks, & L. K. Pickering.** 1999. Molecular epidemiology of childhood astrovirus infection in child care centers. *J. Infect. Dis.* 180: 514-517.
- Moe, C. L., J. R. Allen, S. S. Monroe, H. E. Gary Jr., C. D. Humphrey, J. E. Herrmann, N. R. Blacklow, C. Carcamo, M. Koch, K. H. Kim, & R. I. Glass.** 1991. Detection of astrovirus in pediatric stool samples by immunoassay and RNA probe. *J. Clin. Microbiol.* 29: 2390-2395.
- Molberg, O., E. M. Nilsen, L. M. Sollit, H. Scott, P. Brandtzaeg, E. Thorsby, & K. E. Lundin.** 1998. T cells with specific reactivity against astrovirus isolated from human small intestine. *Gastroenterology* 114: 115-122.
- Monroe, S. S., S. E. Stine, L. Gorelkin, J. E. Herrmann, N. R. Blacklow, & R. I. Glass.** 1991. Temporal synthesis of proteins and RNAs during Human Astrovirus infection of cultured cells. *J. Virol.* 65: 641-648.
- Monroe, S. S., B. Jiang, S. E. Stine, M. Koopmans, & R. I. Glass.** 1993. Subgenomic RNA sequence of human astrovirus supports classification of *Astroviridae* as a new family of RNA viruses. *J. Virol.* 67: 3611-3614.
- Monroe, S. S., M. J. Carter, J. E. Herrmann, et al.** 1995. Family *Astroviridae*. In: Murphy FA, Fauquet CM, Bishop DL, et al. eds. *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses*. New York: Springer-Verlag 364: 367.
- Moscardi, F.** 1999. Assessment of the application of baculoviruses for control of lepidoptera. *Annu. Rev. Entomol.* 44: 257-289.
- Mustafa, H., E. A. Palombo, & R. F. Bishop.** 1998. Improved sensitivity of astrovirus-specific RT-PCR following culture of stool samples in CaCo-2 cells. *J. Clin. Virol.* 11: 103-107.
- Mustafa, H., E. A. Palombo, & R. F. Bishop.** 2000. Epidemiology of astrovirus infection in young children hospitalized with acute gastroenteritis in Melbourne, Australia, over a period of four consecutive years, 1995 to 1998. *J. Clin. Microbiol.* 38: 1058-1062.

N

Naficy, A. B., M. R. Rao, J. L. Holmes, R. Abu-Elyazeed, S. J. Savarino, T. F. Wierzba, R. W. Freneck, S. S. Monroe, R. I. Glass, & J. D. Clemens. 2000. Astrovirus diarrhea in Egyptian children. *J. Infect. Dis.* 182: 685-690.

Nagesha, H.S., L. F. Wang, & A. D. Hyatt. 1999. Virus-like particles of calicivirus as epitope carriers. *Arch. Virol.* 144: 2429-2439.

Noel, J. S., T. W. Lee, J. B. Kurtz, R. I. Glass, & S. S. Monroe. 1995. Typing of human astroviruses from clinical isolates by enzyme immunoassay and nucleotide sequencing. *J. Clin. Microbiol.* 33: 797-801.

O

O'Reilly, D. R., L. K. Miller, & V. A. Luckow. 1992. Baculovirus expression vectors: a laboratory manual. W. H. Freeman, New York, NY.

Oh, D. & E. Schreier. 2001. Molecular characterization of human astroviruses in Germany. *Arch. Virol.* 146: 443-455.

Oishi, I., K. Yamazaki, T. Kimoto, Y. Minekawa, E. Utagawa, S. Yamazaki, S. Inouye, G. S. Grohmann, S. S. Monroe, S. E. Stine, C. Carcamo, T. Ando, & R. I. Glass. 1994. A large outbreak of acute gastroenteritis associated with astrovirus among students and teachers in Osaka, Japan. *J. Infect. Dis.* 170: 439-443.

Oliver, A. R. & A. D. Phillips. 1988. An electron microscopical investigation of faecal small round viruses. *J. Med. Virol.* 24: 211-218.

P

Pager, C. T. & A. D. Steele. 2003. Astrovirus-associated diarrhea in South African adults. *Clin. Inf. Dis.* 35: 1452-1453.

Palombo, E. A. & R. F. Bishop. 1996. Annual incidence, serotype distribution, and genetic diversity of human astrovirus isolates from hospitalized children in Melbourne, Australia. *J. Clin. Microbiol.* 34: 1750-1753.

Pang, X. L. & T. Vesikari. 1999. Human astrovirus-associated gastroenteritis in children under 2 years of age followed prospectively during a rotavirus vaccine trial. *Acta Paediatr.* 88: 532-536.

Parashar, U. D., E. G. Hummelman, J. S. Bresee, M. A. Miller, & R. I. Glass. 2003. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerg. Infect. Dis.* 9: 565-572.

Pearson, M. N., R. L. Q. Russell, G. F. Rohrman, & G. S. Beaudreau. 1988. P39, a major baculovirus structural protein: immunocytochemical characterization and genetic location. *Virology* 167: 407-413.

Peränen, J., K. Takkinen, N. Kalkkinen, & L. Kääriäinen. 1988. Semliki Forest virus-specific non-structural protein nsP3 is a phosphoprotein. *J. Gen. Virol.* 69: 2165-2178.

Pintó, R. M., J. M. Díez, & A. Bosch. 1994. Use of the colonic carcinoma cell line CaCo-2 for *in vivo* amplification and detection of enteric viruses. *J. Med. Virol.* 44: 310-315.

Pintó, R. M., F. X. Abad, R. Gajardo, & A. Bosch. 1996. Detection of infectious astroviruses in water. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1811-1813.

Pintó R.M., S. Guix, J. F. González-Dankaart, S. Caballero, G. Sánchez, Ke-J. Guo, E. Ribes, & A. Bosch. 2003. Hepatitis A virus polyprotein processing by *Escherichia coli* proteases. *J. Gen. Virol.* 83: 359-368.

Prasad, B. V. V., R. Rothnagel, X. I. Jiang, & M. K. Estes. 1994. Three-dimensional structure of baculovirus-expressed Norwalk virus capsids. *J. Virol.* 68: 5117-5125.

R

Rao, A. L. & G. L. Grantham. 1996. Molecular studies on bromovirus capsid protein. II. Functional analysis of the amino-terminal arginine-rich motif and its role in encapsidation, movement, and pathology. *Virology* 226: 294-305.

Risco, C., J. L. Carrascosa, A. M. Pedregosa, C. D. Humphrey, & A. Sánchez-Fauquier. 1995. Ultrastructure of human astrovirus serotype 2. *J. Gen. Virol.* 76: 2075-2080.

Román, E., I. Wilhelmi, J. Colomina, J. Villar, M. L. Cilleruelo, V. Nebreda, M. Del Alamo, & A. Sánchez-Fauquier. 2003. Acute viral gastroenteritis: proportion and clinical relevance of multiple infections in Spanish children. *J. Med. Microbiol.* 52: 435-440.

Ruiz, M. C., A. Charpilienne, F. Liprandi, R. Gajardo, F. Michelangeli, & J. Cohen. 1996. The concentration of Ca²⁺ that solubilizes outer capsid proteins from rotavirus particles is dependent on the strain. *J. Virol.* 70: 4877-4883.

S

Saito, K., H. Ushimija, O. Nishio, M. Oseto, H. Motohiro, Y. Ueda, M. Takagi, S. Nayaka, T. Ando, R. Glass, et al. 1995. Detection of astroviruses from stool samples in Japan using reverse transcription and polymerase chain reaction amplification. *Microbiol. Immunol.* 39: 825-828.

Sakon, N., K. Yamazaki, E. Utagawa, Y. Okuno, & I. Oishi. 2000. Genomic characterization of human astrovirus type 6 Katano virus and the establishment of a rapid and effective reverse transcription-polymerase chain reaction to detect all serotypes of human astrovirus. *J. Med. Virol.* 61: 125-131.

Sánchez, G., S. Caballero, S. Guix, A. Bosch, & R. M. Pintó. 2003. Antigenic hepatitis A virus structures may be produced in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69: 1840-1843.

Sánchez-Fauquier, A., A. L. Carrascosa, J. L. Carrascosa, A. Otero, R. I. Glass, J. A. López, C. San Martín, & J. A. Melero. 1994. Characterization of a human astrovirus serotype 2 structural protein (VP26) that contains an epitope involved in virus neutralization. *Virology* 201: 312-320.

Schlesinger, S. & M. J. Schlesinger. 1996. *Togaviridae*, p.825-841. In: B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley, D. E. Griffin, M. A. Martin, R. A. Lamb, B. Roizman, and S. E. Strauss (ed.), *Fields virology*. Lippincott-Raven, Philadelphia. Pa.

Schmitz I. & A. L. Rao. 1998. Deletions in the conserved amino-terminal basic arm of cucumber mosaic virus coat protein disrupt virion assembly but do not abolish infectivity and cell-to-cell movement. *Virology* 248: 323-331.

Schwarz, B. A., R. Bange, T. W. Vahlenkamp, R. Johne, & H. Müller. 2002. Detection and quantitation of group A rotaviruses by competitive and real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods* 105: 277-285.

Shastri, S., A. M. Doane, J. Gonzales, U. Upadhyayula, & D. M. Bass. 1998. Prevalence of astroviruses in a children's hospital. *J. Clin. Microbiol.* 36: 2571-2574.

Shimizu, M., J. Shirai, M. Narita, & T. Yamane. 1990. Cytopathic astrovirus isolated from porcine acute gastroenteritis in an established cell line derived from porcine embryonic kidney. *J. Clin. Microbiol.* 28: 201-206.

Snodgrass, D. R. & E. W. Gray. 1977. Detection and transmission of 30 nm virus particles (astrovirus) in faeces of lambs with diarrhoea. *Arch. Virol.* 55: 287-291.

Snodgrass, D. R., K. W. Angus, E. W. Gray, J. D. Menzies, & G. Paul. 1979. Pathogenesis of diarrhoea caused by astrovirus infections in lambs. *Arch. Virol.* 60: 217-226.

Steinhaus, E. A. 1947. Principles of insect pathology. McGraw-Hill: New York.

Stauss, E. G., E. M. Lenches, & J. H. Strauss. 1988. Nonstructural proteins nsP3 and nsP4 of Ross River and O'Nyong-nyong viruses: sequence and comparison with those of other alphaviruses. *Virology* 164: 264-274.

Summers, M. D. & G. E. Smith. 1978. Baculovirus structural polypeptides. *Virology* 84: 390-402.

Svenungsson, B., A. Lagergren, E. Ekwall, B. Evengard, K. Olof Hedlund, A. Kärnell, S. Löfdahl, L. Svensson, & A. Weintraub. 2000. Enteropathogens in adult patients with diarrhea and healthy control subjects: a 1-year prospective study in a Swedish clinic for infectious diseases. *Clin. Inf. Dis.* 30: 770-778.

T

Taylor, M. B., W. O. K. Grabow, & W. D. Cubitt. 1997. Propagation of human astrovirus in the PLC/PRF/5 hepatoma cell line. *J. Virol. Methods* 67: 13-18.

Taylor, M. B., N. Cox, M. A. Very, & W. O. K. Grabow. 2001a. The occurrence of hepatitis A and astroviruses in selected river and dam waters in South Africa. *Water Res.* 35: 2653-2660.

Taylor, M. B., J. Walter, T. Berke, D. W. Cubitt, D. K. Mitchell, & D. O. Matson. 2001b. Characterisation of a South African human astrovirus as type 8 by antigenic and genetic analyses. *J. Med. Virol.* 64: 256-261.

Thiem, S. M. & L. K. Miller. 1989. Identification, sequence, and transcriptional mapping of the major capsid protein gene of the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *J. Virol.* 63: 2008-2018.

Touzé, A., L. Boursarghin, C. Ster, A. Combita, P. Roingeard, & P. Coursaget. 2001. Gene transfer using human polyomavirus BK virus-like particles expressed in insect cells. *J. Gen. Virol.* 82: 3005-3009.

Traore, O., G. Belliot, C. Mollat, H. Piloquet, C. Chamoux, H. Laveran, S. S. Monroe, & S. Billaudel. 2000. RT-PCR identification and typing of astroviruses and Norwalk-like viruses in hospitalized patients with gastroenteritis: evidence of nosocomial infections. *J. Clin. Virol.* 17: 151-158.

Tuittila, M. & A. E. Hinkkanen. 2003. Amino acid mutations in the replicase protein nsP3 of Semliki Forest virus cumulatively affect neurovirulence. *J. Gen. Virol.* 84: 1525-1533.

Tzipori, S, J. D. Menzies, & E. W. Gray. 1981. Detection of astrovirus in the faeces of red deer. *Vet. Rec.* 108: 286.

U

Unicomb, L. E., N. N. Banu, T. Azim, A. Islam, P. K. Bardhan, A. S. G. Faruque, A. Hall, Ch. L. Moe, J. S. Noel, S. S. Monroe, M. J. Albert, & R. I. Glass. 1998. Astrovirus infection in association with acute, persistent and nosocomial diarrhea in Bangladesh. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 17: 611-614.

V

van Regenmortel, M. H. V., C. M. Fauquet, D. H. L. Bishop, E. B. Carstens, M. K. Estes, S. M. Lemon, J. Manilov, M. A. Mayo, D. J. McGeoch, C. R. Pringle, & R. B. Wickner. 2000. *Virus taxonomy*, p. 1162 Academic Press, San Diego.

Vialard, J. E. & C. D. Richardson. 1993. The 1629-nucleotide open reading frame located downstream of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus polyhedrin gene encodes a nucleocapsid-associated phosphoprotein. *J. Virol.* 67: 5859-5866.

Vihinen, H., T. Ahola, M. Tuittila, A. Merits, & L. Kääriäinen. 2001. Elimination of phosphorylation sites of Semliki Forest Virus replicase protein nsP3. *J. Biol. Chem.* 276: 5747-5752.

W

Walter, J. E., J. Briggs, M. L. Guerrero, D. O. Matson, L. K. Pickering, G. Ruiz-Palacios, T. Berke, & D. K. Mitchell. 2001. Molecular characterization of a novel recombinant strain of human astrovirus associated with gastroenteritis in children. *Arch. Virol.* 146: 2357-2367.

Wang, Q., J. Kakizawa, L. Weng, M. Shimizu, O. Nishio, Z. Fang, & H. Ushijima. 2001. Genetic analysis of the capsid region of astroviruses. *J. Med. Virol.* 64: 245-255.

- White, L. J., M. E. Hardy, & M. K. Estes.** 1997. Biochemical characterization of a smaller form of recombinant Norwalk virus capsids assembled in insect cells. *J. Virol.* 71: 8066-8072.
- Wilhelmi, I., E. Roman, & A. Sánchez-Fauquier.** 2003. Viruses causing gastroenteritis. *Clin. Microbiol. Infect.* 9: 247-262.
- Willcocks, M. M., M. J. Carter, F. R. Laidler, & C. R. Madeley.** 1990. Growth and characterization of human faecal astrovirus in a continuous cell line. *Arch. Virol.* 113: 73-82.
- Willcocks, M. M., M. J. Carter, J. G. Silcock, & C. R. Madeley.** 1991. A dot-blot hybridization procedure for the detection of astrovirus in stool samples. *Epidemiol. Infect.* 107: 405-410.
- Willcocks, M. M., N. Ashton, J. B. Kurtz, W. D. Cubitt, & M. J. Carter.** 1994a. Cell culture adaptation of astrovirus involves a deletion. *J. Virol.* 68: 6057-6058.
- Willcocks, M. M., T. D. Brown, C. R. Madeley, & M. J. Carter.** 1994b. The complete sequence of a human astrovirus. *J. Gen. Virol.* 75: 1785-1788.
- Willcocks, M. M., A. S. Boxall, & M. J. Carter.** 1999. Processing and intracellular location of human astrovirus non-structural proteins. *J. Gen. Virol.* 80: 2607-2611.
- Williams, G. V., & P. Faulker.** 1997. Cytological changes and viral morphogenesis during baculovirus infection. *The baculoviruses.* 61-107. In: L. K. Miller. New York: Plenum.
- Williams, F. P.** 1980. Astrovirus-like, coronavirus-like, and parvovirus-like particles detected in the diarrhea stools of beagle pups. *Arch. Virol.* 66: 216-226.
- Williams, F. P.** 1989. Electron microscopy of stool-shed viruses: retention of characteristic morphologies after long-term storage at ultralow temperatures. *J. Med. Virol.* 29: 192-195.
- Wood, D. J., T. J. David, I. L. Chrystie, & B. Totterdell.** 1988. Chronic enteric virus infection in two T-cell immunodeficient children. *J. Med. Virol.* 24: 435-444.
- Woode, G. N. & J. C. Bridger.** 1978. Isolation of small viruses resembling astroviruses and caliciviruses from acute enteritis of calves. *J. Med. Microbiol.* 11: 441-452.
- Woode, G. N., J. F., Pohlenz, N. E., Kelso Gourley, & J. A. Fagerland.** 1984. Astrovirus and breda virus infections of dome cell epithelium of bovine ileum. *J. Clin. Microbiol.* 19: 623-630.

Y

Yuen, K. Y., P. C. Woo, R. H. Liang, E. K. Chiu, F. F. Chen, S. S. Wong, Y. L. Lau, S. Y. Ha, J. S. Peiris, H. Siau, & T. K. Chan. 1998. Clinical significance of alimentary tract microbes in bone marrow transplant recipients. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 30: 75-81.

9. APÉNDICE III:

PUBLICACIONES

Publicaciones.

Los artículos listados a continuación y publicados a lo largo de la realización del doctorado se agrupan en dos grandes bloques:

1.- Relacionados con los estudios de la tesis doctoral:

“Molecular epidemiology of astroviruses infection in Barcelona, Spain”.

Guix, S., S. Caballero, C. Villena, R. Bartolomé, C. Latorre, N. Rabella, M. Simó, A. Bosch, & R.M. Pintó.

J. Clin. Microbiol., 2002 Jan; 40 (1): 133-139.

“Persistent gastroenteritis in children infected with astrovirus: association with serotype-3 strains”.

Caballero S., S. Guix, W.M. El-Senousy, I. Calicó, R.M. Pintó & A. Bosch.

J. Med. Virol., 2003 Oct; 71 (2): 245-250.

“Structural requirements of astrovirus virus-like particles assembled in insect cells”.

Caballero S., S. Guix, E. Ribes, A. Bosch, & R.M. Pintó.

J. Virol., 2004 Dec; 78: In press.

“C-terminal nsP1a protein of human astrovirus colocalizes with the endoplasmic reticulum and viral RNA”.

Guix S., S. Caballero, A. Bosch, & R.M. Pintó.

J. Virol., 2004 Dec; 78: In press.

“Effects of variability of the nsP1a/4 protein hypervariable region of human astrovirus on virus replication in cultured cells”.

Guix S., S. Caballero, A. Bosch, & R.M. Pintó.

Submitted to *Virology*, 2004 Sep.

2.- No relacionados con los estudios de la tesis doctoral:

“Astrovirus detection in wastewater samples”.

Pintó R.M., C. Villena, F. Le Guyader, S. Guix, S. Caballero, M. Pommepuy, & A. Bosch
Wat. Sci. Tech., 2001; 43 (12): 73-76.

“Potential role of fomites in the vehicular transmission of human astroviruses”.

Abad F.X., C. Villena, S. Guix, S. Caballero, R.M. Pintó, & A. Bosch
Appl. Environ. Microbiol., 2001 Sept; 67 (9): 3904-3907.

“PDT photosensitisers for blood sterilisation: virus photoinactivation and red blood cell toxicity assay”.

Ziólkowski P., M. Jelén, P. Marszalik, E. Piasecki, M.A. Vallés, D.B. Berezin, A. El Merouani, A.M. Gómez, V. Pérez, R. Bonnet, P.A. Shatunov, R.M. Pintó, S. Caballero, M.A. De Madariaga, M. Mora, M.L. Sagristá, F. Postigo, O.I. Koifman, & A.S. Semeykin.
Porphyrin Chemistry Advances, 2001; 3 (10): 179-90.

“Hepatitis A virus polyprotein processing by *Escherichia coli* proteases”.

Pintó R.M., S. Guix, J.F. González-Dankaart, S. Caballero, G. Sánchez, Ke-J. Guo, E. Ribes, & A. Bosch.
J. Gen. Virol., 2002; 83: 359-368.

“Antigenic Hepatitis A virus structures may be produced in *Escherichia coli*”.

Sánchez G., S. Caballero, S. Guix, A. Bosch, & R.M. Pintó.
Appl. Environ. Microbiol., 2003 Mar; 69 (3): 1840-1843.

“Rotavirus virus-like particles as surrogates in environmental persistence and inactivation studies”.

Caballero S., F.X. Abad, F. Loisy, F.S. Le Guyader, J. Cohen, R.M. Pintó, & A. Bosch.
Appl. Environ. Microbiol., 2004 Jul; 70 (7): 3904-3909.